

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

УДК 577.152.611

КОРНЕЛЮК

Олександр Іванович

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ
ЕУКАРІОТИЧНОЇ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ

03.00.03 - Молекулярна біологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1995



AB 37.875

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі структури і функцій нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор Р.П.Виннградова

доктор біологічних наук, професор Е.А.Бурштейн

доктор біологічних наук,

член Нью-Йоркської академії наук Е.А.Козлов

Провідна установа: Інститут біохімії НАН України

Захист відбудеться "27" лютого 1995 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.11.01 з захисту докторських дисертацій в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою:

252627, м.Київ-143, вул. акад.Заболотного,150.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Автореферат розіслано "26" січня 1995 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Л.Л. Лукаш

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми.

Одним з ключових етапів процесу реалізації генетичної інформації є ферментативне аміноацилювання тРНК аміноацил-тРНК синтетазами (АРСази, КФ 6.1.1.) на дорибосомному етапі біосинтезу білка. При впізнаванні аміноацил-тРНК синтетазами гомологічних тРНК реалізується один з найбільш високоспецифічних процесів білково-нуклеїнового впізнавання. Для виявлення молекулярних механізмів специфічного аміноацилювання тРНК необхідне детальне вивчення структурно-функціональної організації АРСаз. Останнім часом були досягнуті успіхи в дослідженні структури АРСаз, в основному, для синтетаз з прокаріотів та нижчих еукаріотів.

Аміноацил-тРНК синтетази з вищих еукаріотів вивчені набагато менше. Слід відзначити, що АРСази з вищих еукаріот відрізняються більш складною структурою в порівнянні з прокаріотичними АРСазами. Це зумовлено ускладненням геному та виникненням диференціації у багатоклітинних організмів, що потребує більшого удосконалення апарату біосинтезу білка та його регуляції. Для АРСаз вищих еукаріотів характерна тенденція до формування високомолекулярних комплексів, а також виявлена множинність молекулярних форм, структурні основи якої вивчені ще недостатньо. Важливо відзначити, що АРСази еукаріотів можуть виконувати також неканонічні функції, наприклад, приймати участь в сплайсингу РНК, асоціації з мРНК, регуляції біосинтезу амінокислот, синтезі Ар₄А та контролі клітинної проліферації, патогенезах при аутоімунних захворюваннях та в інших процесах.

Важливу роль в механізмі функціонування АРСаз відіграють взаємні конформаційні зміни синтетази і тРНК в процесі їх впізнавання. Згідно з сучасними уявленнями функціональні властивості ферментів можуть бути адекватно описані з точки зору їх динаміки в розчині. Отже, для побудови молекулярного механізму функціонування АРСаз необхідне вивчення їх динамічних властивостей у розчині в нативних умовах.

Мета та завдання досліджень. Метою роботи було проведення детального структурно-функціонального дослідження тирозил-тРНК синтетази (КФ 6.1.1.1) вищих еукаріотів. Відповідно до поставленої мети були сформульовані такі задачі:

1. Розробити методики виділення та провести дослідження фізико-хімічних властивостей тирозил-тРНК синтетази з печінки бика.

2. Вивчити можливість асоціації тирозил-тРНК синтетази з печінки бика в високомолекулярний комплекс.

3. Провести імунохімічне дослідження тирозил-тРНК синтетази з використанням моно- та поліклональних антитіл.

4. Дослідити роль електростатичних взаємодій в комплексотворенні між еукаріотичною тирозил-тРНК синтетазою та гомологічною тРНК^{Tyr}.

5. Вивчити будову активного центру тирозил-тРНК синтетази та встановити функціональну роль окремих амінокислотних залишків.

6. Провести дослідження характеристик власної флуоресценції тирозил-тРНК синтетази в розчині та вивчити внутрішньомолекулярну динаміку синтетази.

7. Вивчити конформаційні зміни структури тирозил-тРНК синтетази при взаємодії з низькомолекулярними субстратами:

АТР та L-тирозином, проміжним продуктом реакції тирозил-аденілатом та гомологічною тРНК^{Tyr}.

Основні положення, що винесені до захисту:

1. Тирозил-тРНК синтетаза з печінки бика характеризується множинністю молекулярних форм ферменту. В структурі основної форми синтетази є домен, несуттєвий для каталітичної функції в реакції аміноацилювання тРНК.

2. Еукаріотична тирозил-тРНК синтетаза має еволюційно набуту спорідненість до високомолекулярних РНК, що може бути необхідною для компартменталізації на полірибосомах.

3. Виявлено існування високомолекулярного лабільного комплексу тирозил-тРНК синтетази вищих еукаріот, в складі якого синтетаза більш стійка до термоактивації.

4. Активний центр еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази включає залишки гістидину та цистеїну, які функціонально важливі на етапі активації амінокислоти, та залишки лізину, необхідні на етапі комплексоутворення ферменту з гомологічною тРНК^{Tyr} та її аміноацилювання.

5. Взаємодія тирозил-тРНК синтетази з проміжним продуктом реакції тирозиладенілатом та гомологічною тРНК^{Tyr} супроводжується конформаційними змінами ферменту.

6. Запропонована динамічна модель функціонування тирозил-тРНК синтетази в основі якої лежить внутрішньомолекулярна динаміка ферменту, яка обумовлює конформаційні зміни при взаємодії з субстратами, в тому числі при впізнаванні гомологічної тРНК^{Tyr}, а також взаємну структурну адаптацію центрів зв'язування АТР та тРНК.

Наукова новизна та практична цінність роботи. Вперше проведено структурно-функціональне дослідження еукаріотичної

тирозил-тРНК синтетази, виявлена множинність молекулярних форм ферменту та визначені їх молекулярні та каталітичні характеристики. Встановлена наявність в структурі тирозил-тРНК синтетази фрагменту (20 кДа), який є несуттєвим для каталітичної активності і характеризується високим вмістом залишків лізину та високою гідрофобністю.

Вперше виявлено високомолекулярний лабільний комплекс тирозил-тРНК синтетази вищих еукаріот, в складі якого синтетаза більш стійка до термоінактивації. Синтетаза має еволюційно набуту неспецифічну спорідненість до високомолекулярних РНК, що може бути необхідною для її компартменталізації на полірибосомах.

Проведено імунохімічне дослідження тирозил-тРНК синтетази з використанням моно- та поліклональних антитіл. Показана наявність антигенної детермінанти, яка еволюційно набула тільки тирозил-тРНК синтетазами вищих еукаріотів.

Встановлена роль електростатичних взаємодій у впізнаванні еукаріотичною тирозил-тРНК синтетазою гомологічної тРНК^{Tyr}. Вивчена будова активного центру тирозил-тРНК синтетази і встановлена функціональна роль залишків гістидину, лізину та цистеїну в реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}. Запропонована модель структури активного центру ферменту.

Вивчено характеристики власної флуоресценції тирозил-тРНК синтетази та показана наявність двох компонент в спектрі триптофанової флуоресценції синтетази, одна з яких належить внутрішньоглобулярним, а друга - експонованим залишкам триптофану. Показано наявність швидкої конформаційної рухливості тирозил-тРНК синтетази, для якої характерні низькі енергії активації та регуляція дифузійними характе-

ристиками розчинника.

Виявлені конформаційні зміни тирозил-тРНК синтетази при формуванні проміжного продукту тирозиладенілату та при взаємодії з гомологічною тРНК^{Tyr}. Показано, що швидка диполь-релаксаційна динаміка синтетази змінюється при специфічному впізнаванні гомологічної тРНК^{Tyr}.

Встановлено існування взаємного впливу центрів зв'язування АТР та тРНК^{Tyr} в тирозил-тРНК синтетазі. Конформаційна аміна синтетази при взаємодії з тРНК^{Tyr} індукуює формування оптимальної конформації для зв'язування АТР в активному центрі ферменту. Аналогічна взаємодія центрів зв'язування АТР і тРНК встановлена також для іншої АРСази І-го структурного класу - лейцил-тРНК синтетази осавців.

Пропонується динамічна модель функціонування тирозил-тРНК синтетази, в основі якої лежить внутрішньомолекулярна динаміка ферменту, яка обумовлює конформаційні зміни синтетази при взаємодії з субстратами, в тому числі при впізнаванні гомологічної тРНК^{Tyr}, а також взаємну структурну адаптацію центрів зв'язування АТР та тРНК.

Результати роботи мають теоретичне значення в аспекті зв'язування структурно-функціональної організації та механізму функціонування АРСаз в процесі біосинтезу білка у вищих еукаріотів.

Основні висновки даної роботи використовуються в лекційному курсі "Генетична ензимологія" для студентів біологічного факультету Національного університету імені Тараса Шевченка.

Апробація роботи.

Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на 16-, 18-,

21- та 22-му конгресах СЕО (Москва, 1984; Любляна, 1987; Дублін, 1992; Стокгольм, 1993), радянсько-французьких симпозиумах (Цхалтубо, 1982; Москва, 1986; Київ, 1990; Конкарно, 1991), італійсько-радянських симпозиумах "Макромоллекули в функціонуючій клітці" (Сієна, 1982; Київ, 1984); 5-й Всесоюзній науковій конференції "Проблеми и перспективы ферментативного катализа" (Москва, 1987); III-му Всесоюзному симпозиумі "Равновесная динамика структуры биополимеров" (Пущино, 1987); 6-й та 8-й конференціях молодих вчених соціалістичних країн по біоорганічній хімії (Пущино, 1988; Рига, 1991); VI-й та VII-й конференціях по спектроскопії біополімерів (Харків, 1988, 1991); V-му Українському біохімічному з'їзді (Івано-Франківськ, 1987); 26-й міжнародній конференції по спектроскопії (Софія, 1989); VI-му Всесоюзному симпозиумі по спектроскопії полімерів (Мінськ, 1989); Всесоюзному симпозиумі "Хімія бєлков" (Тбілісі, 1990); 14-му та 15-му міжнародних робочих нарадах по тРНК (Ридзина, 1991, Кап-Даг, 1993); Міжнародній конференції "Біосинтез бєлка" (Пущино, 1991); Всесоюзній нараді "Люмінесцентний анализ в медицине и биологии и его аппаратное обеспечение" (Москва, 1992); Ювілейній науковій конференції Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 1993); Міжнародній школі по вивченню динаміки білків (Стокгольм, 1994).

Публікації. Основні результати роботи викладені в 45 публікаціях, у тому числі 1 монографії та 22 статтях у вітчизняних та зарубіжних журналах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з 6 глав та містить вступ, огляд літератури, матеріали та ме-

тоди дослідження, чотири розділи результатів та їх обговорення, заключення, висновки та описок цитованої літератури. Роботу викладено на сторінках машинописного тексту, вона містить таблиць та рисунків. Список цитованої літератури включає 405 бібліографічних посилань.

Всі дослідження виконано з ініціативи автора та за його безпосередньою участю в експериментах та аналізі результатів.

1. Характеристика множинних молекулярних форм тирозил-тРНК синтетази з печінки бика.

1.1. Виділення та фізико-хімічні властивості основної форми тирозил-тРНК синтетази.

Для очистки тирозил-тРНК синтетази з печінки бика нами запропонована схема, приведена в таблиці 1. Виділення фер-

Таблиця 1. Очистка основної форми тирозил-тРНК синтетази з печінки бика.

Стадія очистки	Білок, мг	Питома актив- ність* $\frac{\text{ІМП} \cdot \text{хв}^{-1}}{\text{мг}^{-1} \cdot 10^{-3}}$	Загальна активність $\frac{\text{ІМП} \cdot \text{хв}^{-1}}{10^{-6}}$	Кратність очистки	Вихід, %
Вихідний екстракт	30000	1,2	36	1	100
Висолювання сульфатом амонію (45-65 %)	6450	3,4	21,9	2,8	60,8
DEAE-целю- лоза, pH 7.6	420	17,3	7,3	14,4	20,3
Сефалеко G-150	59,5	55,5	3,3	46,3	9,2
Фосфоцелю- лоза, pH 6.8	5,4	353,0	1,9	294	5,3
Оксиапатит, pH 6.8	0,31	3910	1,2	3175	3,3

* Активність в реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}.

менту проводили в присутності інгібіторів протеаз: фенилметилсульфонілфториду (ФМСТ) та діізопропілфторфосфату (ДІФФ), в результаті було досягнута очистка в 3175 разів в порівнянні з вихідним екотрактом.

Використовували також модифіковану схему очистки синтетази, в якій проводили фракціонування ПЕТ-6000 (5-9%) та хроматографію на гепарин-сефарозі.

Чистоту фермента, яка становила 95%, визначали по даним електрофорезу в поліакриламідному гелі. Після елюції з гелю тільки ця білкова смуга проявляла ферментативну активність в реакції АТР-[^{32}P] пірофосфатного обміну.

Молекулярну масу тирозил-тРНК синтетази в нативних умовах визначали гель-хроматографією на сефадексі G-200, її величина складає 124 ± 4 кДа. По даним електрофорезу в денатуруючих умовах в присутності 0,1% DS-Na молекулярна маса синтетази складала $59 \pm 1,5$ кДа, отже тирозил-тРНК синтетаза вищих еукаріотів є структурним димером і має четвертинну структуру α_2 .

Основна форма тирозил-тРНК синтетази відзначається високою лабільністю. При використанні в процесі очистки тільки 1 інгібітору протеаз ФМСТ поряд з основною формою синтетази виявляли також форму синтетази з молекулярною масою поліпептидного ланцюга $39 \pm 1,5$ кДа, яка зберігала ферментативну активність як в реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}, так і в реакції АТР-[^{32}P] пірофосфатного обміну. Ми припустили, що ця форма є продуктом обмеженого ендегенного протеолізу основної форми тирозил-тРНК синтетази. Дійсно, при розщепленні основної форми синтетази трипсином (1:100) або еластазою (1:20)

спостерігали появу білкової полоси з M_r 39 кДа, при цьому аміноацилююча активність синтетази не втрачалась.

1.2. Виділення та характеристика ендогенно протеолітично модифікованої функціонально активної форми тирозил-тРНК синтетази.

Ми розробили окрему схему виділення протеолітично модифікованої форми тирозил-тРНК синтетази. Її особливостями були використання тільки одного інгібітора протеаз ФМОФ, фракціонування білків осадженням при рН 5.0 та використання високоефективної рідинної хроматографії на оксиалатиті при рН 6.8. В результаті була досягнута очистка цієї форми ферменту в 5374 рази в порівнянні з вихідним екотрактом.

Молекулярну масу ферменту в нативних умовах визначали високоефективною рідинною хроматографією на колонці "Bio-Sil TSK-250", її величина склала 84 кДа. Отже, модифікована функціонально активна форма тирозил-тРНК синтетази з печінки бика, як і основна форма, теж є структурним димером і має четвертинну структуру типу α_2 .

Каталітичні характеристики двох форм тирозил-тРНК синтетази в реакціях аміноацилювання тРНК^{Тур} та АТР-[³²P] пірофосфатного обміну приведені в таблиці 2.

Величини K_m та k_{cat} для протеолітично модифікованої форми тирозил-тРНК синтетази виявились близькими до каталітичних констант основної форми синтетази як в реакції аміноацилювання гомологічної тРНК^{Тур}, так і в реакції АТР-[³²P] пірофосфатного обміну (таблиця 2).

Було проведено ізоелектрофокусування синтетази (форма 2

Таблиця 2. Каталітичні характеристики двох форм тирозил-тРНК синтетази з печінки бика.

Форма	K _m			k _{cat}
	L-Тур, мкМ	АТР, мМ	тРНК ^{Тур} , мкМ	хв ⁻¹
АТР-[³² P] пірофосфатний обмін				
2 x 59 кДа	28,5	0,29	-	290
2 x 39 кДа	29,0	0,60	-	300
Аміноацилювання тРНК				
2 x 59 кДа	1,0	0,125	0,75	2,97
2 x 39 кДа	1,5	0,160	1,19	2,99

Розрахунки проводили по програмі "Enzfitter".

х 39 кДа) в поліакриламідному гелі з паралельним ізоелектрофокусуванням маркерних білків. Встановлено, що ізоелектрична точка основної смуги ферменту відповідає рІ 5,5, однак спостерігається також кілька мінорних полос, що мають рІ в інтервалі 5,2 - 6,0. Подібна картина гетерогенності по рІ електрофоретично гомогенного білку відома для еукаріотичних аміноацил-тРНК синтетаз і, очевидно, пов'язана з їх ковалентними посттрансляційними модифікаціями.

1.3. Амінокислотний аналіз двох форм тирозил-тРНК синтетази з печінки бика.

Амінокислотний склад двох форм тирозил-тРНК синтетази визначали на амінокислотному аналізаторі "PicoTag" ("Waters"). Основна форма ферменту містить 539 амінокислотних залишків. Порівняння амінокислотного складу двох форм показало, що частина поліпептидного ланцюга, яка відщеплюється при обмеженому протеолізі основної форми і не є суттєвою для аміноацилювання тРНК, насичена позитивно зарядженими залиш-

ками лізину (46 залишків, тобто 80% від їх загальної кількості), а також має виявлений гідрофобний характер (42 залишки лейцину, 25 залишків валіну, 10 залишків ізолейцину). Можна допустити, що цей додатковий домен тирозил-тРНК синтетази може грати певну роль в її компартменталізації в білок-синтезуючому апараті вищих еукаріот шляхом електростатичних і гідрофобних взаємодій з іншими клітинними структурами.

1.4. P1-форма тирозил-тРНК синтетази.

При хроматографії тирозил-тРНК синтетази на фосфоцелюлозі в процесі елюції білків нами виявлені 2 піки активності тирозил-тРНК синтетази в реакції АТР- $[^{32}\text{P}]$ пірофосфатного обміну які елювались, відповідно, при 0,16 і 0,26 М калій-фосфатного буферу (P1- і P2-форми). Тільки P2-форма мала активність в реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr} і є, очевидно, основною формою тирозил-тРНК синтетази. Експерименти по ре-хроматографії P1 і P2-форм на фосфоцелюлозі виключили можливість впливу фосфоцелюлози на формування P1-форми.

P1-форма синтетази була очищена в гомогенному стані. Молекулярна маса цієї форми ферменту в нативних умовах склала біля 126 кДа, а в денатуруючих умовах - 59 кДа. Отже, ця форма синтетази не є продуктом протеолізу основної форми ферменту. Найбільш вірогідно, що формування P1-форми обумовлене ковалентною модифікацією основної форми ферменту.

1.5. Високомолекулярна лабільна форма тирозил-тРНК синтетази.

При гел-фільтрації на сефакрилі S-200 безрибосомного екотракту з печінки бика, отриманого в присутності ДФФ та

СМОФ, тирозил-тРНК синтетаза активність виходить у вільному об'ємі колонки ($M_r > 10^6$ Да). Якщо безрибосомний екстракт отримували в присутності тільки 1 мМ СМОФ, тирозил-тРНК синтетаза активність елюувалась у фракції, що відповідає молекулярній масі 220 кДа. Проміжний комплекс є лабільним, його хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі приводить до утворення вільної форми тирозил-тРНК синтетази. Таким чином, дисоціацію тирозил-тРНК синтетази з комплексу можна описати схемою: високомолекулярний комплекс ($M_r > 10^6$ Да) - проміжний лабільний комплекс (240 кДа) - вільна форма ферменту (120 кДа).

K_m для тРНК^{Туг} в реакції аміноацилювання для лабільного проміжного комплексу становить 1,66 мМ. Порівняння кінетики теплової інактивації (42 °C) проміжного комплексу та вільної форми тирозил-тРНК синтетази, проведеної згідно (Негруцкій, Ельська, 1984) показало, що синтетаза в складі проміжного комплексу ($K_{інакт.} = 0,020$) значно більш стабільна в порівнянні з вільним ферментом ($K_{інакт.} = 0,086$).

1.6. Спорідненість різних форм еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази з печінки бика до високомолекулярних РНК.

Основна форма тирозил-тРНК синтетази (2 x 59 кДа) практично повністю адсорбується на колонці з рРНК-сефарозою та елюється 100 мМ KCl. Протеслітично модифікована форма ферменту (2 x 39 кДа) тільки частково зберігає спорідненість до рРНК, що свідчить про вклад відщеплюваного при протеолізі фрагменту в цю взаємодію. На відмінність від еукаріотичного ферменту, бактеріальна тирозил-тРНК синтетаза не має спорідненості до високомолекулярних РНК. Р1-форма тирозил-тРНК синтетази в описаних умовах не зв'язувалась з рРНК-сефаро-

азю. 16S рРНК E.coli інгібує аміноацилюючу активність основної форми тирозил-тРНК синтетази. Це інгібування носить частково конкурентний по відношенню до тРНК^{Tyr} характер. Відповідно, центри зв'язування рРНК та тРНК можуть частково перекриватись, або рРНК-зв'язуючий центр, що відрізняється від тРНК-зв'язуючого центру, діє на активність тирозил-тРНК синтетази алостерично. В той же час рРНК не впливала на аміноацилюючу властивість тирозил-тРНК синтетази з E.coli та T.thermophilus. Таким чином, спорідненістю до рРНК володіє тільки еукаріотична тирозил-тРНК синтетаза, що, мабуть, необхідно для її компартменталізації на полірибосомах.

2. Імунохімічне дослідження тирозил-тРНК синтетази.

2.1. Характеристика молекулярних форм тирозил-тРНК синтетази за допомогою моноклональних антитіл.

Нами вперше одержані моноклональні антитіла проти тирозил-тРНК синтетази з використанням нового методу селекції гібридом, секретуючих моноклональні антитіла, розробленого спільно з С.Ф.Берестенем (Інститут молекулярної біології РАН). Вивчення моноклональних антитіл лінії Т₃ (мкАТ Т₃) показало, що їх взаємодія з тирозил-тРНК синтетазою не впливає на активність фермента. Одержані дані дозволяють вважати, що антигенна детермінанта для мкАТ Т₃ знаходиться поза активним центром фермента. При аналізі методом імуноблотінгу взаємодії мкАТ Т₃ з ферментом нами виявлено, що антигенна детермінанта зберігається при денатурації білка. Тільки один з розчинних білків, одержаних після хроматографії гомогенату печінки бика на DEAE-Toyopearl взаємодіє з одержаними мкАТ Т₃,

при цьому його рухливість співпадає з тирозил-тРНК синтетазою.

Виникає питання, чи може антигенна детермінанта мкАТ Т₃, яка локалізована поза активним центром тирозил-тРНК синтетази, бути зв'язана з фрагментом поліпептидного ланцюга, який відщеплюється при обмеженому протеолізу. При вивченні імунореактивності мкАТ Т₃ з двома формами тирозил-тРНК синтетази було встановлено, що антигенна детермінанта для мкАТ Т₃ зберігається також і у форми тирозил-тРНК синтетази з меншою молекулярною масою 2 x 39 кДа.

2.2. Вивчення еволюційної консервативності антигенної детермінанти мкАТ Т₃.

Суттєвий інтерес становить вивчення еволюційної консервативності антигенної детермінанти у тирозил-тРНК синтетах різного походження. Нами проведено вивчення взаємодії мкАТ Т₃ з тирозил-тРНК синтетазами з прокаріотів (*E.coli*, *Th. thermophilus*), з нижчих еукаріотів (дріжджі) та з тканин ссавців (печінка кроля, печінка бика, плацента людини). За даними імуноблотінгу мкАТ Т₃ взаємодіє з тирозил-тРНК синтетазою з печінки бика та з печінки кроля, тобто між цими двома ферментами існує імунологічний перехрест. За даними дот-аналізу не виявлено взаємодії мкАТ Т₃ проти тирозил-тРНК синтетази з печінки бика і відповідними ферментами з *E.coli* (1), *Th. thermophilus* (2) і дріжджів (3), тобто антигенна детермінанта присутня тільки у тирозил-тРНК синтетах вищих еукаріотів. Таким чином, на основі одержаних даних можна зробити висновок, що ця антигенна детермінанта є спільною для тирозил-тРНК синтетах ссавців, тобто еволюційно набута

тільки тирозил-тРНК синтетазами вищих еукаріот.

3. Вивчення структури активного центру тирозил-тРНК синтетази з печінки бика.

3.1. Визначення кількості електростатичних контактів між тирозил-тРНК синтетазою та тРНК^{Tyr}.

Була вивчена залежність початкової швидкості реакції аміноацилювання тРНК від концентрації тРНК^{Tyr} в подвійних обернених координатах Лайнуівера-Берка при різній іонній силі розчину. Обробка цієї залежності в координатах Дебая-Хюккеля виявила взаємодію 3,6 (в першому наближенні 4) позитивних та такої ж кількості негативних зарядів. В рамках іншого підходу згідно моделі Дауна одержані дані вказували на існування двох фосфатних груп тРНК, що взаємодіють з такою ж кількістю позитивних заряджених груп в тирозил-тРНК синтетазі. Більш обґрунтованою є модель Дауна, в якій циліндричний поліелектроліт краще моделює структуру тРНК, ніж сферичний макроіон в наближенні Дебая-Хюккеля. Можна допустити, що електростатична взаємодія тРНК з позитивними зарядами на поверхні синтетази реалізується на першому етапі білковонуклеїнового впізнавання.

3.2. Специфічна хімічна модифікація залишків лізину тирозил-тРНК синтетази о-фталевим альдегідом.

Важливо вивчити природу позитивно заряджених груп в еукаріотичній тирозил-тРНК синтетазі, що можуть взаємодіяти з гомологічною тРНК^{Tyr}. Для вивчення функціональної ролі залишків лізину в тирозил-тРНК синтетазі з печінки бика нами

були обрані методи селективних хімічних модифікацій о-фта-
левым альдегідом (ОФА) та піридоксаль-5'-фосфатом (ПФ).

Основною перевагою використання ОФА для модифікації залишків лізину у білках є те, що продукт реакції модифікації має власну флуоресценцію з максимумом при 475 нм. Це дає можливість прямого визначення кількості утвореного продукту реакції по інтенсивності його флуоресценції. Виявилось, що в 1 субодиниці тирозил-тРНК синтетази (форма ферменту 2 x 39 кДа) в денатуруючих умовах (1%-ний додецилсульфат Na) модифікуються приблизно 9 ± 1 залишок лізину (2 залишки лізину не модифікуються, мабуть, з-за ковалентних модифікацій).

Утворення комплексу ферменту з гомологічною тРНК^{Tyr} частково захищає залишки лізину від модифікації ОФА.

Співставляючи залежність ступеню модифікації залишків лізину від значення Р та залежність активності тирозил-тРНК синтетази в реакції аміноацилювання тРНК було встановлено, що 4 ± 2 залишків лізину (на димер тирозил-тРНК синтетази) є істотними на другій стадії реакції аміноацилювання - взаємодії з тРНК та переносі активованого залишку тирозину на тРНК^{Tyr}.

3.3. Модифікація залишків лізину піридоксаль-5'-фосфатом.

Відомо, що піридоксаль-5'-фосфат (ПФ), є реагентом, який здатний специфічно взаємодіяти з нуклеотидз'являючими центрами ферментів. Була вивчена залежність глибини модифікації тирозил-тРНК-синтетази від часу при різній концентрації ПФ. Виявлено, що хімічна модифікація 2 залишків лізину на молекулу ферменту відбувається досить швидко, тоді як 2 інших доступних залишків модифікуються значно повільніше. Як відомо,

одним з основних критеріїв афінної модифікації є те, що залежність початкової швидкості модифікації ферменту амінюється з початковою концентрацією реагенту по гіперболічному закону, досягаючи граничних значень при достатньо високих концентраціях реагенту. Згідно одержаним нами експериментальним даним характер залежності свідчить про насичення реакції і може свідчити на користь припущення про псевдоафінний характер взаємодії ПФ з ферментом.

Модифікація залишків лізину практично не впливала на активність ферменту в реакції $\text{ATP}-[^{32}\text{P}]\text{пірофосфатного}$ обміну. Збереження ферментом активності в реакції $\text{ATP}-[^{32}\text{P}]\text{пірофосфатного}$ обміну при модифікації 4 залишків лізину може, напевно, свідчити про те, що ці залишки не приймають участі у взаємодії з низькомолекулярними субстратами. З іншого боку, це, напевно, може вказувати на відсутність глобальних конформаційних змін у структурі ферменту при модифікації залишків лізину, наслідками яких могла б бути інактивація в реакції аміноацилювання тРНК.

Інкубація з субстратами захищає фермент від інактивації в реакції аміноацилювання тРНК. На початковій ділянці кінетичних кривих максимальний захисний ефект дає гомологічна тРНК^{Тур}. Протягом 15 хв реакції модифікації глибина інактивації ферменту у відсутності субстратів складає 75%, а в присутності тРНК - 15%. Глибина інактивації в присутності АТР та {АТР + L-тирозин} складає 50%. Захисний ефект, що викликається низькомолекулярними субстратами може пояснюватися конформаційними змінами білку, що виникають при зв'язуванні цих субстратів.

Залежність активності тирозил-тРНК синтетази в реакції

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

аміноацилювання тРНК від глибини модифікації ферменту вияви-
ла, що модифікація тільки 1 залишку лізину на димер синте-
тази приводить до інактивації ферменту на 80%. Далі при мо-
дифікації інших 3 залишків, інактивація поступово досягає
90%. Логічно припустити, що Lys, який є найбільш реакційно
здатним, локалізований у центрі зв'язування тРНК або в ката-
літичному центрі (рис.1).

Вивчення швидкості модифікації ферменту ПФ в присутності
АТР і тРНК показало, що максимальний захисний ефект від ко-
валентного приєднання ПФ на лінійній ділянці кінетичної кри-
вої має тРНК^{Tyr}. Як можна бачити, тРНК^{Tyr} захищає від моди-
фікації 1 залишок лізину на димер ферменту. Цей залишок Lys,
мабуть, включається безпосередньо у взаємодію з тРНК^{Tyr} та
його модифікація ПФ приводить до істотної інактивації фер-
менту в реакції аміноацилювання тРНК. Можна припустити, що в
даному випадку ми спостерігаємо прояв антикооперативних вза-
ємодій між тРНК-зв'язуючими центрами, які локалізовані на 2
субодиницях тирозил-тРНК синтетази.

Таким чином, дані по хімічній модифікації залишків лізи-
ну ПФ узгоджуються з результатами модифікації цих залишків
ОФА. З одержаних даних можна зробити висновок, що залишки
лізину тирозил-тРНК синтетази є функціонально важливими на
другій стадії реакції аміноацилювання тРНК і, мабуть, не бе-
руть участі в реакції активації амінокислоти.

Експериментальні дані, одержані у лабораторії Фершта при
вивченні взаємодії тирозил-тРНК синтетази з *B.*
stearothermophilus з тРНК^{Tyr}, показали, що у процесі бі-
лок-нуклеїнового впізнання в цій бактеріальній парі синте-
таза - тРНК приймає участь кластер заряджених груп, але

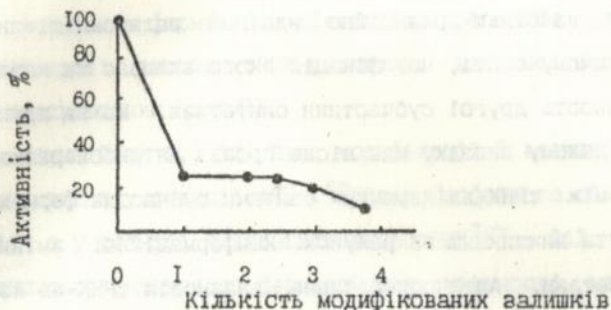


Рис.1. Залежність активності тирозил-тРНК синтетази в реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr} від глибини модифікації ферменту піридоксаль-5'-фосфатом.

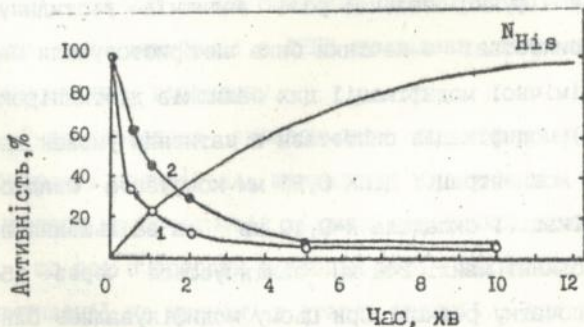


Рис.2. Залежність активності тирозил-тРНК синтетази в реакціях аміноацилювання тРНК^{Tyr} (1) та АТР- $[^{32}P]$ пірофосфатного обміну (2) від часу інкубації з ДЕПК, Р-15.

особливу роль у впізнаванні граз додатковий контакт, що утворюється між залишком Lys-151 та аденіном-73 у tRNA^{Tyr} .

У тирозил- tRNA синтетазі з печінки бика аналогічну роль може грати найбільш реакційно здатний залишок лізину в tRNA -зв'язуючому сайті, модифікація якого впливає на каталітичну активність другої субчастини синтетази. Можна припустити, що в даному випадку має місце проява антикооперативної взаємодії між tRNA -зв'язуючими сайтами субчастин ферменту, яка може бути викликана за рахунок конформаційної зміни в димері синтетази. Антикооперативна взаємодія tRNA -зв'язуючих центрів раніш була показана як для бактеріальної тирозил- tRNA синтетази, так і для інших ферментів цієї групи.

3.4. Хімічна модифікація залишків гістидину тирозил- tRNA синтетази бика

Для вивчення функціональної ролі залишків гістидину у тирозил- tRNA -синтетазі з печінки бика використовували метод специфічної хімічної модифікації цих залишків діетилпірокарбонатом (ДЕПК). Модифікація синтетази в нативних умовах показала, що при концентрації ДЕПК 0,31 мМ константа швидкості реакції модифікації складала $k=0,19 \text{ хв}^{-1}$ та збільшення поглинання при довжині хвилі 240 нм закінчується через 15-20 хвилин після початку реакції. При цьому модифікувались близько 5 залишків гістидину на димер синтетази. Відсутність змін поглинання в області 260-280 нм в диференціальному спектрі модифікованого ферменту свідчить про відсутність модифікації залишків тирозину при даному надлишку реагенту.

Відновлення залишків гістидину інкубацією з гідрокоиламіном (0.5 М, pH 7.0, 24 години, 4 °C) приводить до прак-

тично повного зникнення поглинання при довжині хвилі 240 нм і дозволяє виключити утворення дікарбетоксипоксидних гістидину.

Інкубація ферменту з діетилпірокарбонатом приводить до інактивації тирозил-тРНК-синтетази на обох етапах реакції аміноацилювання (рис.2).

Можна бачити, що при модифікації 2 залишків гістидину інактивація у реакції АТР- $[^{32}\text{P}]$ пірофосфатного обміну складає 72%, а у реакції аміноацилювання тРНК^{Тур} - 91%. Залежність залишкової активності ферменту від кількості модифікованих Ніс дозволяє зробити висновок про суттєву функціональну роль 2 залишків гістидину на молекулу ферменту.

Відновлення залишків гістидину гідроксиламіном приводить до відновлення активності тирозил-тРНК синтетази в реакції аміноацилювання на 75%, а в реакції АТР- $[^{32}\text{P}]$ пірофосфатного обміну - на 90%. Це очевидно свідчить, що інактивація ферменту при інкубації з ДЕК зумовлена утворенням монокарбетоксипоксидних гістидину.

Були проведені експерименти по вивченню впливу різних субстратів реакції на швидкість інактивації тирозил тРНК синтетази на початковій ділянці кінетичної кривої. Встановлено, що всі субстрати в певній мірі захищають фермент від інактивації на кожному з етапів реакції. Але найбільший захисний ефект як в реакції АТР- $[^{32}\text{P}]$ пірофосфатного обміну, так і в реакції аміноацилювання тРНК, має АТР в присутності тирозину.

Можна припустити, що залишки гістидину, які модифікуються, беруть участь у каталізі утворення аміноациладенілату, ймовірно, взаємодіючи з АТР.

При вивченні активного центру тирозил-тРНК синтетази з *B. stearothermophilus* було показано, що залишки гістидину His-45 і His-48, що входять до складу консервативної HIGH-послідовності для аміноацил-тРНК синтетаз першого кла-су, приймають участь у стабілізації перехідного стану комп-лексу $E \cdot \text{Tyr} \cdot \text{MP} \cdot \text{PP}_i$ шляхом взаємодії з АТФ (Fersht, 1988). Можна припустити, що залишки гістидину еукаріотичної тиро-зил-тРНК синтетази виконують аналогічну роль у каталізі.

3.5. Хімічна модифікація залишків цистеїну тирозил-тРНК син-тетази з печінки бика.

Ми вивчали вплив р-хлормеркурібензоату (ПХМБ) на актив-ність тирозил-тРНК синтетази в реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}. Встановлено, що модифікація 1 SH-групи ферменту приводить до 50-90%-ної інактивації тирозил-тРНК синтета-зи. Як низькомолекулярні субстрати, так і гомологічна тРНК^{Tyr} з печінки бика не захищають синтетазу від інактивації ПХМБ (слабкий ефект захисту спостерігався тільки для комплексу синтетази з тирозиладенілатом). Одержані дані дозволяють припустити, що модифіковані SH-групи можуть приймати участь в каталітичному механізмі або в підтриманні структури активно-го центру еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази.

4. Дослідження еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази методами флуоресцентної спектроскопії.

4.1. Параметри власної флуоресценції еукаріотичної тиро-зил-тРНК синтетази.

В роботі виміряні спектри флуоресценції макромолекули

тирозил-ТРНК синтетази при довжинах хвиль збудження 280 і 296 нм. При збудженні на довжині хвилі 296 нм в спектрі флуоресценції ферменту присутня тільки триптофанова компонента. Різниця в положенні максимумів спектрів при збудженні на 280 і 296 нм обумовлена вкладом тирозинової флуоресценції, яка становить біля 5% .

Розраховані нами на основі експериментальних даних параметри власної флуоресценції молекули ферменту представлені в таблиці 3.

Таблиця 3. Параметри власної флуоресценції тирозил-ТРНК синтетази з печінки бика .

Параметр	Довжина хвилі збудження $\lambda_{ex}=280$ нм	Довжина хвилі збудження $\lambda_{ex}=296$ нм
Положення максимуму спектра λ_m , нм	335 ± 1	338 ± 1
Ширина спектру $\Delta\lambda$, нм	56 ± 1	55 ± 1
Квантовий вихід, ϕ	$0,24 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
Ефективність переносу енергії тирозин-триптофан, γ	$0,85 \pm 0,10$	

4.2. Визначення кількості триптофанових залишків і їх локалізації в тирозил-ТРНК синтетазі.

Кількість залишків Trp, визначена згідно методу (Fajot, 1976) становить $6,0 \pm 0,9$ залишків на 1 субодиницю для основної форми синтетази та $3 \pm 0,9$ для форми синтетази 2 x 39 кДа.

Для вивчення локалізації флуорофорів (залишків Trp) в тирозил-ТРНК синтетазі було проведено розкладання спектрів триптофанової флуоресценції по log-нормальним кривим методом розробленим в роботі (Аборнев, Бурштейн, 1992). Виявилося, що спектри випромінювання ферменту, розкладені за даним ал-

горитмом на дві компоненти, належать класам внутрішньоглобулярним і експонованим триптофанових залишкам (у випадку гасіння KI і акриламідом). Положення максимумів спектрів випромінювання цих класів хромофорів відповідають довжинам хвиль 330 ± 1 і 344 ± 1 нм.

Таким чином, залишки триптофану, є природними флуоресцентними зондами в структурі тирозил-тРНК синтетази, локалізованими як всередині білка, так і на його поверхні.

4.3. Внутрішньомолекулярна динаміка макромолекули тирозил-тРНК синтетази по даним температурного гасіння триптофанової флуоресценції.

Індуковане температурою гасіння флуоресценції тирозил-тРНК синтетазою було вивчено шляхом виміру параметрів флуоресценції ферменту в діапазоні $+18 \div +75$ °C. Температурна залежність положення максимуму спектру флуоресценції показує, що в межах температур до $+40$ °C зберігається нативна конформація білка. В діапазоні температур $+40 \div +50$ °C спостерігається зміщення максимуму спектру на 3 нм в довгохвильову область. Була визначена енергія активації процесу гасіння флуоресценції, що становить 21 ± 4 кДж/моль. Представляючи температурну залежність квантового виходу в координатах $1/q = a + b \cdot T/\eta$ (Бурштейн та співавт., 1978), ми припускали, що динаміка білкових груп, враховуючи і внутрішні, залежить від коефіцієнта дифузії розчинника, і тому квантовий вихід білка пропорційний T/η (η - в'язкість розчинника). Отримані залежності лінійні в межах температур до $+40$ °C (тут зберігається нативна конформація білка, нема спектральних

арушень спектру флуоресценції). Відхилення від лінійності при температурах, вищих за $+40^{\circ}\text{C}$, пов'язане, очевидно, з збільшенням температурно-індукованої рухливості окремих частин білкової молекули.

Використовуючи дані про температурну залежність максимуму спектру випромінювання тирозил-тРНК синтетази при збудженні на хвилях 280 і 296 нм і вважаючи, що спектральні зміни в інтервалі $+20 \div +50^{\circ}\text{C}$ визначаються дипольною реорієнтаційною релаксацією оточення триптофанових залишків у ферменті, були визначені часи дипольної орієнтаційної релаксації (τ_r) в даному температурному інтервалі. При цьому користувались відповідним рівнянням (Демченко, 1986). Розраховані часи релаксації змінюються в межах 7 - 12 нс в діапазоні температур $+20 \div +50^{\circ}\text{C}$. Лінійність залежності в координатах Арреніуса свідчить про активаційний характер дипольно-орієнтаційної рухливості мікрооточення триптофанових залишків в синтетазі. Величина енергії активації становить 14 ± 3 кДж/моль.

Отже, результати наших досліджень показали, що для внутрішньомолекулярної рухливості тирозил-тРНК синтетази при температурі до $+40^{\circ}\text{C}$ характерні низькі енергії активації і опосередкована регуляція дифузійними характеристиками розчинника. Це справедливо як для експонованих на поверхні, так і для внутрішніх ділянок макромолекули.

4.4. Конформаційна рухливість тирозил-тРНК синтетази по даним гасіння флуоресценції низькомолекулярними гасниками.

Нами показано незначне зменшення інтенсивності флуоресценції при додаванні до розчину синтетази йодиду. Це дозво-

для припустити, що йодид контактує тільки з невеликою частиною залишків триптофану, локалізованих на поверхні тирозил-тРНК синтетази, а основна їх частина для йодиду недоступна.

Експериментальні залежності інтенсивності флуоресценції синтетази від концентрації акриламиду мають характерні особливості зіткнувального механізму гасіння флуоресценції. Лінійність графіку в координатах Лерера свідчить про те, що в тирозил-тРНК синтетазі можуть бути виділені два класи флуорофорів - доступні і повністю недоступні для акриламиду. Результати розрахунків параметрів гасіння флуоресценції молекули ферменту акриламідом за рівнянням Лерера (Lehrer, 1971) наведені в таблиці 4.

Для з'ясування механізму гасіння досліджена залежність ефективності гасіння флуоресценції акриламідом від в'язкості розчинника, що досягалось додаванням в розчин гліцерину з масовим вмістом - 0; 10; 25 і 50 %. Як видно з таблиці 4, при збільшенні в'язкості розчинника константа гасіння зменшується, а доля доступності залишається незмінною.

Якщо взяти до уваги, що гасіння можливе при зіткненні хромофора і гасника, то залежність ефективності гасіння від в'язкості розчинника, може означати, що доступна для гасника частина триптофанилів знаходиться в контакті з гасником впродовж часу життя збудженого стану хромофора - близько 10^{-9} с. Це дозволяє припустити, що доступні акриламиду триптофанили, що обумовлюють біля 74 % сумарної інтенсивності флуоресценції (таблиця 4), очевидно, розташовані усередині білкової матриці. При цьому контакт акриламиду з триптофанилами може бути здійснений завдяки масштабним флуктуаціям

білкової структури, що вводять її в стан з відкритою і закритою порожниною для розчинника.

Таблиця 4. Залежність константи Штерна-Фольмера (K^{SV}) і відносної доступності триптофанових залишків тирозил-ТРНК синтетази (f) для гасіння флуоресценції акриламідом від в'язкості розчинника.

Вміст гліцерину, %	В'язкість розчинника $\eta, 10^3 \text{ Па}\cdot\text{с}$	K^{SV} M^{-1}	f
0	0,895	13,2	0,74
10	1,249	10,0	0,74
25	1,805	7,5	0,74
50	5,024	4,5	0,74

Отже, результати досліджень гасіння триптофанової флуоресценції низькомолекулярними гасниками свідчать про наявність швидкої (наносекундної) конформаційної рухливості молекули тирозил-ТРНК синтетази в розчині, яка приводить білкову матрицю в стан з відкритою і закритою порожниною для розчинника.

4.5. Локальні конформаційні флуктуації молекули тирозил-ТРНК синтетази (форма 2 x 39 кДа).

Вивчали температурну залежність характеристик безвипромінювального переносу енергії збудження між залишками триптофана і флуоресцентним зондом піридоксаль-5'-фосфатом, введеним по залишках лізину, які локалізовані в ТРНК-зв'язуючому центрі ферменту (розділ 3.3).

Амплітуду локальних конформаційних флуктуацій тирозил-ТРНК синтетази у розчині оцінювали за параметром f [Somogyi et al., 1984], що є відношенням ефективності перене-

су енергії збудження між донором і акцептором до квантового виходу донорної флуоресценції і пов'язаний з відношенням γ/R (γ - амплітуда флуктуацій акцептора навколо положення рівноваги, R - відстань донор-акцептор). Одержані дані дозволяють припустити, що амплітуда конформаційних флуктуацій варіює в межах $0,5 \div 2,8 \text{ \AA}$.

4.6. Конформаційні зміни тирозил-тРНК синтетази при формуванні тирозиладенілату та взаємодії з гомологічною тРНК^{Tyr}.

Для дослідження змін конформації тирозил-тРНК синтетази застосували метод резонансного переносу енергії збудження за механізмом Ферстера між залишками Tyr та ковалентно приєднаним флуоресцентним зондом N-[1(йодацетил)аміно]етил-5-нафтиламіно-1-сульфокислота (AEDANS). Цей зонд локалізований поза активним центром синтетази (форма 2 x 59 кДа).

При взаємодії синтетази з ATP і L-тирозином спостерігається гасіння флуоресценції AEDANS, відповідно, на 27 і 22%. Однак, при формуванні проміжного продукту реакції тирозиладенілату спостерігалось збільшення інтенсивності флуоресценції зонду на 34 %. При цьому ефективність переносу енергії збудження на AEDANS зростала від 81 до 90 %, а відстань донор-акцептор зменшувалась від до $24,4 \text{ \AA}$ (таблиця 5, рис 3). Можна зробити висновок, що тирозил-тРНК синтетаза зазнає конформаційної зміни при формуванні тирозиладенілату.

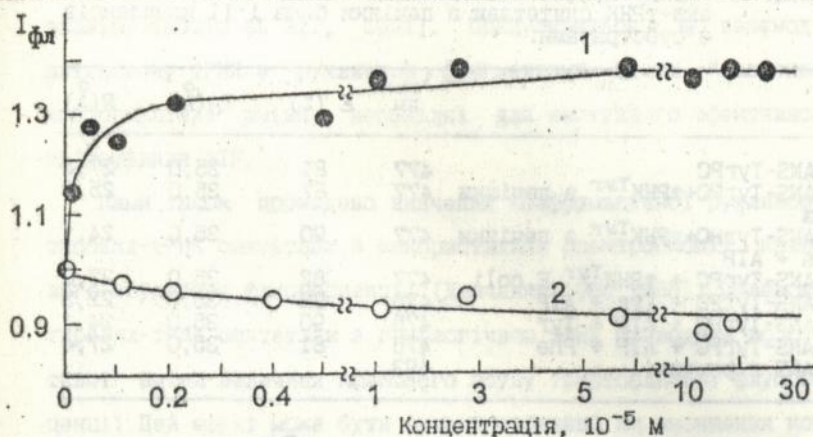


Рис.3.Залежність інтенсивності флуоресценції тирозил-тРНК синтетази, міченої AEDANS, від концентрації тирозиладенілату (1) та при додаванні фенілаланіну до комплексу синтетази з АТР (2).

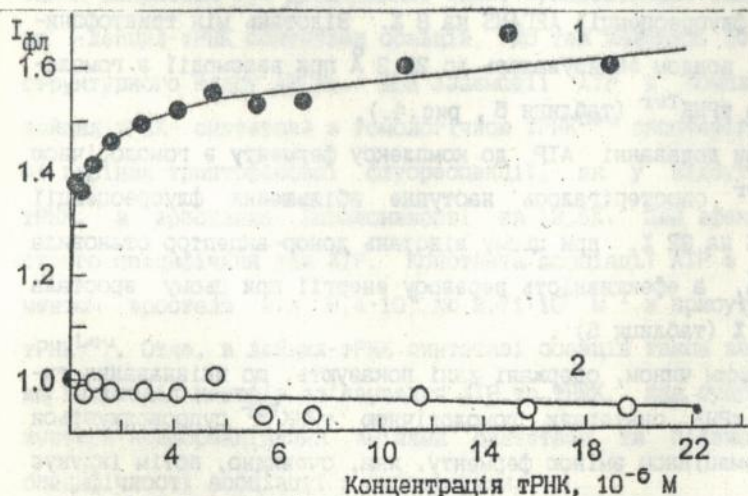


Рис.4.Залежність інтенсивності флуоресценції AEDANS-міченої тирозил-тРНК синтетази від концентрації тРНК. 1 - тРНК^{Tyr} а печінки бика, 2 - тРНК^{Tyr} E.coli.

Таблиця 5. Флуоресцентні властивості AEDANS-міченої тирозил-тРНК синтетази з печінки бика і її комплексів з субстратами.

	λ_{max} , нм	E (%)	$R_0(\text{\AA})$	$R(\text{\AA})$
AEDANS-TyrPC	477	81	35,0	27,4
AEDANS-TyrPC+тРНК ^{Tyr} з печінки бика	477	87	35,0	25,3
AEDANS-TyrPC+тРНК ^{Tyr} з печінки бика + ATP	477	90	35,0	24,1
AEDANS-TyrPC + тРНК ^{Tyr} E.coli	477	82	35,0	27,0
AEDANS-TyrPC + Tyr + ATP	476	93	35,0	22,3
AEDANS-TyrPC + ATP + Tyr	476	90	35,0	24,1
AEDANS-TyrPC + ATP + Phe	476	81	35,0	27,4
AEDANS в розчині	493			

Взаємодія ферменту з гомологічною тРНК^{Tyr} приводить до збільшення флуоресценції зв'язаного зонда AEDANS на 25 %, тоді як при взаємодії з тРНК^{Tyr} E.coli, яка не аміноацилюється еукаріотичною синтетазою, спостерігається лише гасіння флуоресценції AEDANS на 8 %. Відстань між триптофанами і зондом зменшувалась до 25.3 $\text{\AA}$ при взаємодії з гомологічною тРНК^{Tyr} (таблиця 5, рис.4.).

При додаванні ATP до комплексу ферменту з гомологічною тРНК^{Tyr} спостерігалось наступне збільшення флуоресценції AEDANS на 32 %, при цьому відстань донор-акцептор становила 24.1 $\text{\AA}$, а ефективність переносу енергії при цьому зростала до 90 % (таблиця 5) .

Таким чином, одержані дані показують, що впізнавання тирозил-тРНК синтетази гомологічною тРНК^{Tyr} супроводжується конформаційною зміною ферменту, яка, очевидно, потім індукуює формування оптимальної конформації для наступного зв'язування ATP в активному центрі синтетази. Подібний ефект недавно описаний для комплексу глутамініл-тРНК синтетази з тРНК^{Gln}

E.coli в кристалічному стані по даним рентгеноструктурного аналізу (Rould et al., 1991). Припускається, що взаємодія антикодону тРНК з рухливими фрагментами білка "запускає" конформаційні зміни, необхідні для наступного ефективного зв'язування АТР.

Нами також проведено вивчення конформаційної рухливості тирозил-тРНК синтетази з використанням спектроскопії крайового збудження флуоресценції (Демченко, 1986, 1988). Взаємодія тирозил-тРНК синтетази з гомологічною тРНК приводила до суттєвої зміни величини крайового зсуву триптофанової флуоресценції. Цей ефект може бути інтерпретований як зменшення конформаційної рухливості синтетази в окремих ділянках, які, вірогідно, залучені в тРНК-зв'язуючому центрі.

Взаємний вплив центрів зв'язування АТР та тРНК нами був також виявлений при дослідженні іншої еукаріотичної синтетази - лейцил-тРНК синтетази осавців, що теж належить до I-го структурного класу АРСаз. При взаємодії АТР з комплексом лейцил-тРНК синтетази з гомологічною тРНК^{Leu} спостерігалось не гасіння триптофанової флуоресценції, як у відсутності тРНК, а зростання інтенсивності на 13,5%. Цей ефект був строго специфічний для АТР. Константа асоціації АТР з ферментом зростала від $8,4 \cdot 10^4$ до $2,71 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ в присутності тРНК^{Leu}. Отже, в лейцил-тРНК синтетазі осавців також виявлено взаємодія центрів зв'язування АТР та тРНК, яка супроводжується конформаційними змінами синтетази та підвищенням специфічності асоціації з субстратами.

4.7. Динамічна модель функціонування тирозил-тРНК синтетази.

Одержані нами експериментальні дані дозволяють сформулювати динамічну модель функціонування тирозил-тРНК синтетази в процесі аміноацилювання гомологічної тРНК. В основі цієї моделі лежить внутрішньомолекулярна динаміка ферменту, яка виявлена при флуоресцентних дослідженнях цього ферменту. Внутрішньомолекулярна динаміка може обумовлювати конформаційні зміни синтетази при взаємодії з субстратами в тому числі при впізнаванні гомологічної тРНК. Завдяки конформаційній рухливості синтетази може реалізовуватись синергична взаємодія між центрами зв'язування тРНК і АТР, яка приводить до взаємної структурної адаптації цих центрів і підвищення специфічності реакції аміноацилювання. Такий механізм може реалізовуватись також і для інших АРСаз I-го структурного класу.

ВИСНОВКИ:

1. Виділена в гомогенному стані тирозил-тРНК синтетаза з печінки бика та вивчені її фізико-хімічні та каталітичні властивості. Синтетаза є структурним димером α_2 -типу з M_r 2 x 59 кДа. Виявлена множинність молекулярних форм еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази. В безрибосомному екстракті з печінки бика тирозил-тРНК синтетаза знаходиться в складі високомолекулярного комплексу з молекулярною масою більш як 1000 кДа, з якого фермент дисоціює через проміжний лабільний комплекс до вільної форми синтетази. Поряд з основною формою існує повністю активна ендогенно протеолітично модифікована

форма M_r 2 x 39 кДа і Р1-форма, яка є активною тільки в реакції утворення тирозиладенілату. Р1-форма складається з двох не ідентичних по хроматографічному поведінню субодиниць, одна з яких ковалентно модифікована.

2. Тирозил-тРНК синтетаза має еволюційно набуту неспецифічну спорідненість до високомолекулярних РНК, яка, напевно, необхідна для компартменталізації на полірибосомах.

3. Проведено імунохімічне дослідження тирозил-тРНК синтетази з використанням моноклональних та поліклональних антитіл. Показано, що одна з антигенних детермінант локалізована поза активним центром ферменту і є спільною для обох форм тирозил-тРНК синтетази. Ця детермінанта є еволюційно набутою тільки тирозил-тРНК синтетазами вищих еукаріот та відсутня у нижчих еукаріот (дріжджів) та бактерій.

4. Вивчено будову активного центру тирозил-тРНК синтетази методами селективних хімічних модифікацій. Встановлена функціональна роль залишків гістидину в каталітичній стадії реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr} та залишків лізину на стадії комплексоутворення ферменту з тРНК. Встановлена також функціональна роль SH-груп в реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}.

5. Вивчена роль електростатичних взаємодій в комплексоутворенні синтетази з гомологічною тРНК^{Tyr} в рамках моделей Дебая-Хюккеля та Дауна і визначена кількість електростатичних контактів між ферментом та тРНК.

6. Дослідженням власної триптофанової флуоресценції ти-

рогил-тРНК синтетази показана наявність двох компонент , одна з яких відповідає внутрішньоглобулярним залишкам триптофану, а друга - експонованим до розчинника триптофанілам.

7. Методами флуоресцентної спектроскопії показано наявність швидкої конформаційної рухливості тирозил-тРНК синтетази ,для якої характерні низькі енергії активації та опосередкована регуляція дифузійними характеристиками розчинника.

8. Виявлені конформаційні зміни тирозил-тРНК синтетази при утворенні проміжного продукту тирозиладенілату та при взаємодії з гомологічною тРНК^{Tyr}. Встановлено існування конформаційної взаємодії між центрами зв'язування АТР та тРНК^{Tyr}.

9. Методом флуоресцентної спектроскопії досліджена лейцил-тРНК синтетаза осавців. Показано взаємний вплив центрів зв'язування АТР та тРНК^{Leu}, який приводить до підвищення специфічності зв'язування субстратів.

10. Запропонована динамічна модель функціонування тирозил-тРНК синтетази , в основі якої лежить внутрішньомолекулярна динаміка ферменту, яка обумовлює конформаційні зміни при взаємодії з субстратами, в тому числі при впізнаванні гомологічної тРНК^{Tyr}, а також взаємну структурну адаптацію центрів зв'язування АТР та тРНК.

Основні роботи, надруковані за темою дисертації:

1. Мацука Г.Х., Ельская А.В., Коваленко М.И., Корнелюк А.И. Транспортные рибонуклеиновые кислоты. - К. :Наук.думка, 1976.-219 с.
2. Корнелюк А.И. ЯМР-спектроскопия транспортной РНК/Сб. "Мо-

- лекулярная биология". - К.: Наук. думка. - 1976. - т. 12. - С. 99-115.
3. Корнелюк А.И. Метод расчета параметров связывания аминокцил-тРНК синтетаз с субстратами по данным флуоресцентного титрования//Методы молекулярной биологии. - К.: Наук. думка. - 1979. - С. 140-142.
 4. Корнелюк А.И., Мацука Г.Х., Шилин В.В. Изучение взаимодействий лейцил-тРНК синтетазы с субстратами методом флуоресцентной спектроскопии//Укр. биохим. журнал. - 1980. - т. 52, N1. - С. 79-83.
 5. Корнелюк А.И., Мацука Г.Х., Шилин В.В. Флуоресцентный анализ доступности триптофаных остатков лейцил-тРНК синтетазы в фермент-субстратных комплексах//Биофизика. - 1980. - т. 25, N3. - С. 402-404.
 6. Корнелюк А.И., Емец В.Г., Дмитренко А.А., Жиликова Т.А., Шейкин В.И. Гидратация транспортной РНК по данным ядерного спин-эхо эксперимента//Тезисы докл. 1-го Всесоюзного биофизического съезда, Москва, 1982. - т. 1. - С. 60.
 7. Matsuka G.Kh., Kornelyuk A.I., Tukalo M.A., Shilin V.V. The study on the interaction between leucyl-tRNA synthetase from mammary gland and its substrates//Quaderni de "La Ricerca Scientifica", 1984. - v. 113. - P. 117 -124.
 8. Корнелюк А.И., Шилин В.В., Гудаера О.И., Рожко О.Г., Мацука Г.Х. Химическая модификация триптофаных остатков лейцил-тРНК синтетазы N-бромсукцинимидом и 2-окси-5-нитробензилбромидом//Биоорганическая химия. - 1985. - т. 11, N5. - С. 605-612.
 9. Осадчук Т.В., Корнелюк А.И. Применение флуоресцентной спектроскопии для идентификации А- и В- цепей тромбина

- при их хроматографическом разделении// Укр.биохим.журнал.-1986.-т.58, N3.-С.54-58.
10. Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мадука Г.Х.Выделение и физико-химические свойства тирозил-тРНК синтетазы из печени быка//Тезисы докладов Республ.конференции "Макромолекулы и функционирование клетки", Ереван,1986.-С.24.
 11. Курочкин И.В., Крупская И.В., Корнелюк А.И., Мадука Г.Х.Физико-химические свойства тирозил-тРНК синтетазы из печени быка//Докл.АН УССР.Сер.Б.-1986.- N12.-С.65-68.
 12. Kornelyuk A.I., Kurochkin I.V., Matsuka G.Kh.Conformational mobility of tyrosyl-tRNA synthetase in solution//Abstracts of 2nd International Meeting "Molecular and cellular regulation of enzyme activity", Halle,1986.- P.111.
 13. Курочкин И.В., Корнелюк А.И., Рибкинская Т.А., Гнатенко Д.В., Мадука Г.Х.Гетерогенность тирозил-тРНК синтетазы из печени быка//Тезисы докладов 5-го Укр.биохим.съезда, Киев,1987.-С.41.
 14. Kornelyuk A.I., Kurochkin I.V., Ribkinska T.A., Matsuka G.Kh.Isolation and some properties of tyrosyl-tRNA synthetase of beef liver//Abstracts of 18th European FEBS Meeting, Ljubljana,1987.-P.120.
 15. Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мадука Г.Х.Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства//Молекулярная биология.-1988.- т.22, N1.- С.176-186.
 16. Корнелюк А.И.Структурное окружение триптофановых остатков и конформационная подвижность в тирозил-тРНК синтетазе из печени быка//Тезисы 4-й Конференции по спектрос-

копии биополимеров, Харьков, 1988. - С.165.

17. Курочкин И.В., Гнатенко Д.В., Рибкинська Т.А., Корнелюк А.И. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка: выделение и характеристика множественных форм фермента //Тезисы докладов 5-й Конференции молодых ученых соцотран по биоорганической химии, Пушкино, 1988. -С.54-55.
18. Kornelyuk A.I., Kurochkin I.V., Ribkinska T.A., Gnatenko D.V., Matsuka G.Kh. Tyrosyl-tRNA synthetase from beef liver: generation of multiple enzyme forms by endogenous proteolysis//Abstracts of the International Seminar on Interferon and Biotechnology, Havana, 1989. - S06.066.
19. Гуца Т.О., Клименко И.В., Корнелюк А.И. Конформационная подвижность полипептидной цепи тирозил-тРНК синтетазы по данным флуоресцентной спектроскопии //Тезисы докладов VI Всесоюзного координационного совещания по спектроскопии полимеров, Минск, 25-28 октября, 1989. -С.37.
20. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Изучение функциональной роли остатков лизина тирозил-тРНК синтетазы из печени быка методом химической модификации о-фталевым альдегидом//Доклады АН УССР. Сер.Б. -1991. -№5. -С. 140-143.
21. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Роль электростатических взаимодействий в реакции аминокислотирования тРНК, катализируемой тирозил-тРНК-синтетазой//Доклады АН УССР. -1991. - N 6. - С.145-148.
22. Гнатенко Д.В., Курочкин И.В., Рибкинська Т.А., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК-синтетазы из печени быка//Укр. биохимический

журнал. - 1991. - т.63, N 4. - С.61-67.

23. Kornelyuk A.I., Gnatenko D.V., Rybkina T.A., Matsuka G.Kh. Characterization of two forms of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver // Abstracts of International Conference "Protein Biosynthesis", Pushchino, 1991, P.75.
24. Клименко И.В., Корнелюк А.И. Равновесная динамика тирозил-тРНК синтетазы по данным температурного тушения триптофановой флуоресценции // Тезисы докладов VII Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров, Харьков, 1991. - С.41.
25. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Матсука Г.Х. Тирозил-тРНК-синтетаза из печени быка. Изучение функциональной роли остатков гистидина // Биоорганическая химия. - 1991. - т.17, N 8. - С.1033-1037.
26. Gnatenko D.V., Kornelyuk A.I., Matsuka G.Kh. Tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver: functional role of histidine and lysine residues // Abstracts of 8th International Conference of Young Scientists on Organic and Bioorganic Chemistry, Riga, 1991. - P.142.
27. Рыбкинская Т.А., Вартанян О.А., Филоненко В.В., Сидорик Л.Л., Корнелюк А.И., Берестец С.Ф. Метод селекции гибридом, секретирующих моноклональные антитела, основанный на энзиматической активности фермента // Биополимеры и клетки. - 1990. - т.6, N4. - С.97-101.
28. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Лаврик О.И. Изучение функциональной роли остатков лизина в эукариотической тирозил-тРНК синтетазе методами химических модификаций // Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума "Химия белков",

Тбилиси, 1990. - С. 130.

29. Гуца Т.О., Клименко И.В., Корнелюк А.И. Наносекундная конформационная подвижность тирозил-тРНК синтетазы в растворе по данным тушения триптофановой флуоресценции // Докл. АН УССР. Сер. Б. - 1990. - N 7. - С. 77-80.
30. Klimenko I.V., Guscha T.O., Kornelyuk A.I. Conformational mobility of polypeptide chain of tyrosyl-tRNA synthetase studied by fluorescence spectroscopy // Abstracts of VI Symposium on Optical Spectroscopy, Neubrandenburg, DDR, 1990. - P. 87.
31. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мацука Г.Х. Высокомолекулярный лабильный комплекс тирозил-тРНК-синтетазы из печени быка // Биополимеры и клетка. - 1991. - т. 7, N 1. - С. 68-69.
32. Курочкин И.В., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК-синтетазы с высокомолекулярными РНК // Молекулярная биология. - 1991. - т. 25, N 3. - С. 779-785.
33. Kornelyuk A.I., Gnatenko D.V., Matsuka G.H., Lavrik O.I. Evidence for essential histidine and lysine residues in tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver // 14th International tRNA Workshop, Rydzyna, 1991. - P. 173.
34. Рибкинская Т.А., Берестень С.Ф., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Биополимеры и клетка. - 1991. - т. 7, N 5. - С. 33-36.
35. Клименко И.В., Гуца Т.О., Корнелюк А.И. Свойства триптофановой флуоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Биополимеры и клетка. - 1991. - т. 7, N 6. - С.

83-88.

36. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Лаврик О.И. Химическая модификация остатков лизина тирозил-тРНК синтетазы из печени быка с помощью пиридоксаль-5'-фосфата // Биохимия. - 1991. - т.56, N 11- С.56-60.
37. Клименко И.В., Корнелюк А.И. Поляризация флуоресценции и вращательная подвижность остатков триптофана эукариотической тирозил-тРНК синтетазы // Тезисы докладов VI-го Всесоюзного совещания "Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратурное обеспечение", Москва, 1992. - С.19-20.
38. Gnatenko D.V., Kornelyuk A.I., Matsuka G.Ch. One lysine residue of tyrosyl- tRNA synthetase from bovin liver is critical for amino- acylation of tRNA^{Tyr} // Abstracts of 21th FEBS Meeting, Dublin, 1992, Supplementary Abstracts. - Tu-180.
39. Kornelyuk A.I., Klimenko I.V., Kalachnyuk L.G., Odynets K.A. Conformational changes of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase in the course of tyrosyl adenylate formation and cognate tRNA binding revealed from fluorescence energy transfer measurements // Abstracts of 15th International tRNA Workshop, Cap d'Agde, France, May 30 - June 4, 1993. - P.344.
40. Kalachnyuk L.G., Gnatenko D.V., Odynets K.A., Kornelyuk A.I., Matsuka G.Ch. The contacts of bovine tRNA^{Tyr} with tyrosyl-tRNA synthetase studied by footprinting experiments // Abstracts of 15th International tRNA Workshop, Cap d'Agde, France, May 30 - June 4, 1993. - P.341.

41. Gnatenko D.V., Klimenko I.V., Kornelyuk A.I., Odynets K.A. Conformation fluctuations of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase in solution studied by fluorescence spectroscopy//Abstracts of 22nd Meeting of the FEBS, Stockholm, Sweden, July 4-9, 1993. -P.190.
42. Клименко И.В., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Конформационное изменение тирозил-ТРНК синтетазы из печени быка при взаимодействии с гомологичной ТРНК по данным флуоресцентной спектроскопии//Биополимеры и клетка.-1993.-т.9, N 6.-С.29-33.
43. Kornelyuk A.I., Klimenko I.V. Fluorescence spectroscopic study of intramolecular dynamics of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase in solution//Abstracts of International School "Understanding Protein Motion", Stockholm, 1994. -P.34.
44. Kornelyuk A.I., Klimenko I.V., Odynetz K.A. Conformational changes of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase in the course of specific interaction of cognate tRNA^{Tyr}//Abstracts of International School "Understanding Protein Motion", Stockholm, 1994. -P.35.
45. Kornelyuk A.I., Klimenko I.V., Odynets K.A. Conformational change of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase induced by tyrosyl adenylate formation//Biochemistry and Molecular Biology International.-1994.- v.35.-P.

Korneluyk A.I. Structural and functional investigation of eukaryotic tyrosyl-tRNA synthetase.

Doctor of Sciences Dissertation, specialization 03.00.03 - Molecular Biology, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1994.

The materials of 45 scientific publications of the studies of structural and functional organization of tyrosyl-tRNA synthetase from higher eukaryotes are defended. It has been established that tyrosyl-tRNA synthetase reveals the multiple molecular forms and has a rRNA affinity. Enzyme active site contains His, Lys and Cys residues. The dynamical model of tyrosyl-tRNA synthetase action is proposed according which the intramolecular dynamics determines the conformational changes in the course of substrate binding.

Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование эукариотической тирозил-тРНК синтетазы.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 45 научных работ, которые содержат материалы экспериментальных исследований структурно-функциональной организации тирозил-тРНК синтетазы высших эукариот. Обнаружена множественность молекулярных форм фермента и изучены их особенности. Тирозил-тРНК синте-

таза обладает эволюционно приобретенным сродством к рРНК. Активный центр синтетазы содержит остатки His, Lys и Cys. Предложена динамическая модель функционирования тирозил-тРНК синтетазы в реакции аминоацилирования тРНК, согласно которой внутримолекулярная динамика белка определяет конформационные изменения синтетазы при взаимодействии с субстратами.

Ключові слова: еукаріоти, тирозил-тРНК синтетаза, множинність форм, активний центр, конформаційні зміни.

Handwritten signature

Зам. 16. Формат 60x84/16. Обл-вид.арк. 2,0
Підписано до друку 17.01.1995 р. Тираж 100.

Поліграфічна дільниця ІТФ ім. М.М.Боголюбова НАН України

156507

AB 31.813
AB 31.813