

Сравнительное исследование физико-химических свойств тирозил-тРНК синтетаз из *Thermus thermophilus* и *Escherichia coli*

С. П. Егорова, А. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Проведено сравнение физико-химических свойств тирозил-тРНК синтетаз (КФ 6.1.1.1) из *T. thermophilus* и *E. coli*. Определены величины констант Михаэлиса для тРНК^{Tyr} из мезофила и термофила, L-тирозина и АТФ в реакции аминоацилирования тирозил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus* при 37, 65 и 75 °С, оптимальные концентрации КСl в реакциях перекрестного аминоацилирования. Осуществлен сравнительный анализ аминокислотного состава термофильной и мезофильной тирозил-тРНК синтетаз. Получены температурные зависимости скоростей реакций пирофосфатного обмена и аминоацилирования тРНК, температурные зависимости термостабильности обоих ферментов.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы представляют группу ферментов, играющих существенную роль в реализации генетической информации. Их специфическое взаимодействие с тРНК до сих пор является одной из важнейших проблем молекулярной биологии. Особый интерес вызывает функционирование аминоацил-тРНК синтетаз при высоких температурах.

Изучение особенностей функционирования аминоацил-тРНК синтетаз при высоких температурах и взаимосвязь их с термостабильностью имеют большое значение для понимания природы и механизмов взаимодействия этих ферментов с субстратами. Поэтому одним из подходов к исследованию природы термостабильности белков является сравнительное изучение их физико-химических свойств, взаимосвязи между термостабильностью и функцией аналогичных ферментов из мезофильных и термофильных источников.

Тирозил-тРНК синтетаза из экстремального термофила *T. thermophilus*, живущего при 75 °С, была выделена в гомогенном состоянии и кратко охарактеризована лишь недавно [1], в то время

как ферментативные свойства и структура активного центра тирозил-тРНК синтетаз из *E. coli* и *Bacillus stearothermophilus* изучались в течение ряда лет [2–7]. Целью настоящей работы было сравнительное исследование физико-химических свойств тирозил-тРНК синтетаз из термофила (*T. thermophilus*) и мезофила (*E. coli*).

Материалы и методы. Биомасса *T. thermophilus* НВ-27 была наработана в ИБФМ АН России (Пушино). Суммарный препарат тРНК из *E. coli*, содержащий 0,93 % тРНК^{Tyr}, получен из НИИ прикладной биохимии (Олайн, Латвия). Суммарный препарат тРНК из *T. thermophilus*, содержащий 1,1 % тРНК^{Tyr}, получен нами, как описано в [8], с некоторыми модификациями.

Пострибосомный супернатант *E. coli*, содержащий тирозил-тРНК синтетазу, любезно предоставлен О. И. Лаврик (Институт биоорганической химии, Россия).

В работе использовали ДЭАЭ-целлюлозу DE-52 («Whatman», Англия), ДЭАЭ-сефарозу («Pharmacia», Швеция), Тоуорепарл НВ-65 («Toyo Soda», Япония), оксиапатит («Bio-Rad», США), гепарин-сефарозу («Pharmacia»). Выделение препарата тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* НВ-27 и определение тирозил-тРНК синтетазной

активности в реакции аминоацилирования проводили, как описано ранее [1]. Для выделения препарата тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli* MRE-600 использовали высаливание сульфатом аммония, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, ДЭАЭ-сефарозе, оксиапатите и гепарин-сефарозе. Осадок, полученный после высаливания пострибосомного супернатанта сульфатом аммония (50 % насыщения), диализовали против 25 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,6, содержащего 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 0,1 мМ азид натрия (буфер А). Диализ проводили в течение 20 ч со сменой буфера. Белок наносили на колонку (4,5 × 47 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной буфером А.

Белок элюировали 2,5 л в градиенте концентрации от 0,05 М калий-фосфатного буфера, рН 7,6, до 0,25 М калий-фосфатного буфера, рН 6,5. Фракции, содержащие тирозил-тРНК синтетазную активность, высаливали сульфатом аммония (50 % насыщения) и хроматографировали на колонке (3 × 27 см) с ДЭАЭ-сефарозой в буфере Б: 20 мМ трис-НСl буфер, рН 7,9, содержащий 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид натрия, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид и 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Белок элюировали в том же буфере в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,3 М. Объем градиента составлял 1400 мл.

Активную фракцию тирозил-тРНК синтетазы диализовали в течение 20 ч против 5 мМ калий-фосфатного буфера, рН 6,8, содержащего 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ азид натрия, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид (буфер В), и наносили на колонку (2,5 × 14,3 см) с оксиапатитом, уравновешенным буфером В.

Фермент элюировали 1 л линейного градиента концентрации калий-фосфатного буфера от 0,01 до 0,4 М. Фракцию, обладающую тирозил-тРНК синтетазной активностью, диализовали в буфере Б, наносили на колонку (0,5 × 15 см) с гепарин-сефарозой, уравновешенной буфером Б. Белок элюировали в том же буфере в градиенте концентрации KCl от 0 до 0,25 М. Объем градиента составлял 0,5 л. Очищенный препарат тирозил-тРНК синтетазы хранили при -20 °С в буфере Б, содержащем 50 % глицерина.

Кинетические свойства тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* изучали, варьируя концентрацию одного субстрата при насыщающих концентрациях других субстратов при 37 и 65 °С.

Концентрации субстратов варьировали в следующих пределах: АТФ — от $2,5 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-4}$ М, L-тирозин — от $2 \cdot 10^{-6}$ до $1,8 \cdot 10^{-5}$ М, тРНК^{Tyr} из *E. coli* — от $0,5 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-6}$ М, тРНК^{Tyr} из *T.*

thermophilus от $0,4 \cdot 10^{-7}$ до $1,5 \cdot 10^{-6}$ М. Кинетические данные обрабатывали по методу двойных обратных величин Лайнуивера-Берка [9] с использованием компьютерной программы Enzfitter [10].

Аминокислотный состав тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* определен И. В. Назимовым (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Россия). Метод, использованный для определения аминокислотного состава, не позволил определить содержание Cys и Trp аминокислотных остатков.

Стандартная смесь для определения активности в реакции аминоацилирования тРНК при различных температурах содержала в 0,05 мл: 100 мМ трис-НСl буфер, рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ, 0,2 мМ [¹⁴C]тирозин, 5 мг/мл суммарного препарата тРНК *E. coli* или *T. thermophilus*, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0,8 мкг/мл тирозил-тРНК синтетазы. Время инкубации составляло 0,5 мин при различных температурах. Реакцию останавливали, как описано в [1]. Реакцию пирофосфатного обмена проводили в инкубационной смеси объемом 0,1 мл, содержащей 100 мМ трис-НСl, рН 8,0, 2,5 мМ АТФ, 10 мМ MgCl₂, 1,5 мМ L-тирозин, 20 мкг бычьего сывороточного альбумина, 5—10 мкМ [³²P]пирофосфата аммония. Инкубировали в течение 5 мин при различных температурах. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,2 М пирофосфата натрия в 5 %-м растворе трихлоруксусной кислоты, затем в пробы вносили 0,2 мл 5 %-й водной суспензии активированного угля Norit А («Serva», ФРГ), пробы оставляли на 30 мин при 0 °С. Осадки наносили на фильтры GF/C («Whatman», Англия), отмывали 60 мл дистиллированной воды и закрепляли на фильтрах пропусканием 2 мл 2 %-го раствора поливинилового спирта в воде.

Кривые термоинактивации мезофильного и термофильного ферментов получены измерением их остаточной активности методом пирофосфатного обмена. Белок растворяли в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Белковую смесь инкубировали при различных температурах. Через определенные промежутки времени из этой смеси отбирали аликваты объемом 20 мкл, содержащие по 0,04 мкг фермента.

Остаточную активность белка в отобранных аликватах определяли с помощью пирофосфатного обмена: 5 мин при 30 и 65 °С для мезофильного и термофильного ферментов соответственно. Для устранения эффекта испарения при инкубировании белка при высоких температурах на поверхность белковой смеси настилали парафиновое масло

(«Флика», Швейцария). Кривые термостабильности тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli* получены измерением их остаточной активности после инкубации в течение 5 мин при различных температурах методом пирофосфатного обмена. Для изучения защитного эффекта тРНК при термоинактивации белка в белковую смесь вносили суммарную тРНК из *T. thermophilus* или *E. coli* в расчете 100 мкг на 0,04 мкг фермента.

Результаты и обсуждение. Для выяснения структурных различий, обеспечивающих возможность функционирования термофильной тирозил-тРНК синтетазы при высоких температурах, проведено сравнение аминокислотных составов термофильного и мезофильного ферментов. Аминокислотный состав тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli* определен ранее [2]. Поскольку молекулярные массы ферментов немного отличаются (на $\approx 5\%$), для более корректного сравнения данные для каждого типа аминокислотных остатков были представлены в виде мольных долей, выраженных в процентах.

Как видно из сравнительной диаграммы на рис. 1, термофильный фермент содержит значительно большее количество Pro, Leu, Arg и меньшее количество Asp, Lys по сравнению с мезофильным ферментом. Количество гидрофобных аминокислот в мезофильном белке составляет 40%, в то время как фермент из *T. thermophilus* содержит 48% гидрофобных остатков. Увеличение содержания гидрофобных аминокислот было показано для тер-

мофильных фенилаланил-тРНК синтетазы [11] и серил-тРНК синтетазы [12] по сравнению с аналогичными мезофильными ферментами. На основании полученных данных мы предположили, что в случае тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* экстремальная термофильность фермента обеспечивается заметным изменением аминокислотного состава за счет увеличения содержания гидрофобных аминокислотных остатков. Хотя данное предположение и не является общим правилом, как, например, в случае с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, где увеличения содержания гидрофобных аминокислотных остатков не наблюдалось [13].

Для дальнейшей работы с тирозил-тРНК син-

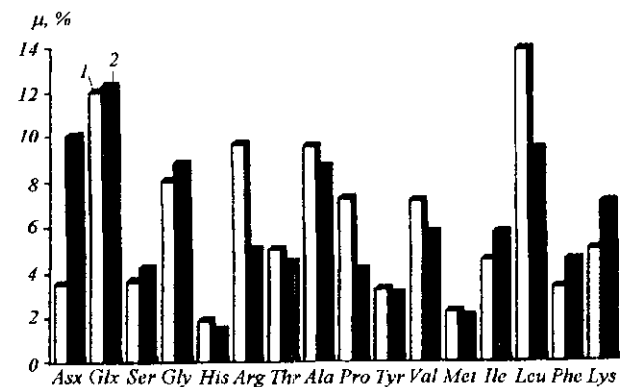


Рис. 1. Сравнительный аминокислотный состав тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli* (в мольных %): 1 — фермент из *T. thermophilus*; 2 — фермент из *E. coli*

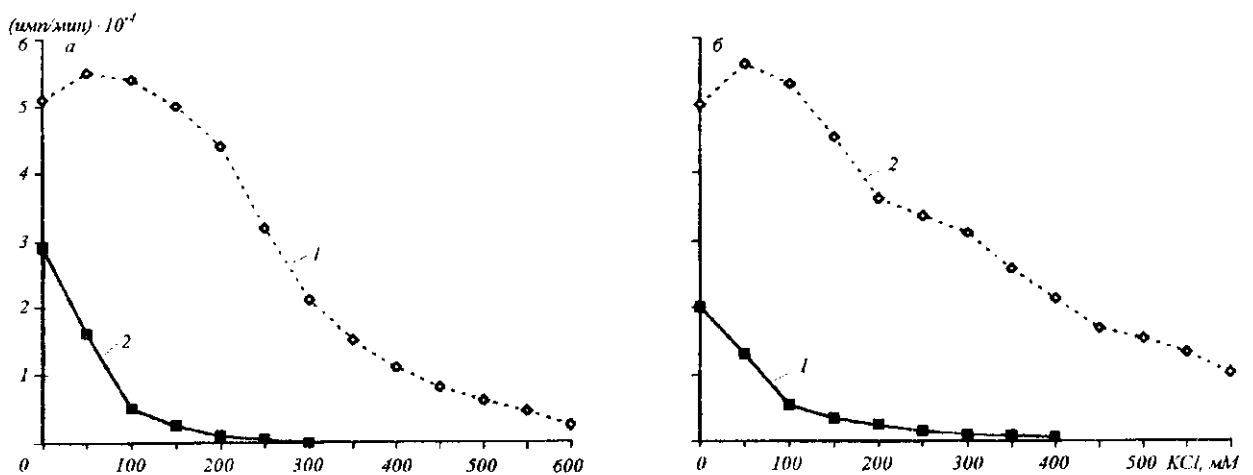


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей образования тирозил-тРНК, катализируемых тирозил-тРНК синтетазами из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б), от концентрации KCl при использовании тРНК из *T. thermophilus* (1) и *E. coli* (2)

тетазой из *T. thermophilus* были проведены эксперименты по определению участков прямолинейной зависимости образования тирозил-тРНК^{Tyr} от времени инкубации и определению концентрации субстратов, не лимитирующих начальной скорости образования тирозил-тРНК^{Tyr}. Изучение влияния концентраций тРНК и Mg²⁺, не лимитирующих начальной скорости реакции, показало, что они составляют при 0,04 мкг фермента: 250 мкг тРНК и 15–20 мМ MgCl₂.

Сравнение реакций аминокислотирования тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* и *E. coli*, катализируемых термофильным ферментом, показало, что уровень аминокислотирования для гомологичной тРНК^{Tyr} повышается с ростом концентрации KCl от 0 до оптимальной 80 мМ и затем слабо уменьшается при дальнейшем увеличении концентрации KCl до 200 мМ. При последующем возрастании концентрации KCl уровень аминокислотирования значительно падает. Для гетерологичной тРНК^{Tyr} из *E. coli* имеет место значительное уменьшение уровня аминокислотирования при увеличении концентрации KCl от 0 до 300 мМ (рис. 2, а).

Аналогичный эксперимент был проведен для тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli*. Оптимум аминокислотирования мезофильного фермента с гомологичной тРНК^{Tyr} имеет место при 20 мМ KCl, тогда как для гетерологичной тРНК^{Tyr} наблюдается резкое уменьшение уровня аминокислотирования при увеличении концентрации KCl от 0 до 300 мМ (рис. 2, б). Такие значительные различия влияния ионов калия предполагают, что особенности образования продуктивного комплекса тРНК — синте-

таза существенно отличаются для гомологичного и гетерологичного комплексов.

Как показано ранее [1], температурный оптимум реакции аминокислотирования, катализируемой термофильной тирозил-тРНК синтетазой, находится в области 75 °С для тРНК^{Tyr} *T. thermophilus*; для гетерологичной тРНК^{Tyr} — при 50 °С (рис. 3, а). В случае фенилаланил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* температурные оптимумы находятся в области 70 и 80 °С соответственно [14]. Эти показатели были изучены также для реакции аминокислотирования, катализируемой тирозил-тРНК синтетазой из *E. coli*. Они находятся в области 41 °С для гомологичной тРНК и 45 °С — для гетерологичной (рис. 3, б).

Как видно из графиков, температурные оптимумы реакции аминокислотирования, катализируемой термофильной синтетазой, значительно отличаются для гомологичной и гетерологичной тРНК. Разница между ними составляет 25 °С. Такое существенное различие, очевидно, связано с некоторыми структурными отличиями тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* и *E. coli*, определяющих оптимальное узнавание тирозил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus*. В случае мезофильного фермента разница между температурными оптимумами составляет всего 4 °С.

Константы Михаэлиса для АТР, L-тирозина, тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* и *E. coli* при различных температурах в реакции аминокислотирования, катализируемой тирозил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus*, приведены в табл. 1. При сравнении кинетических характеристик термофильного фер-

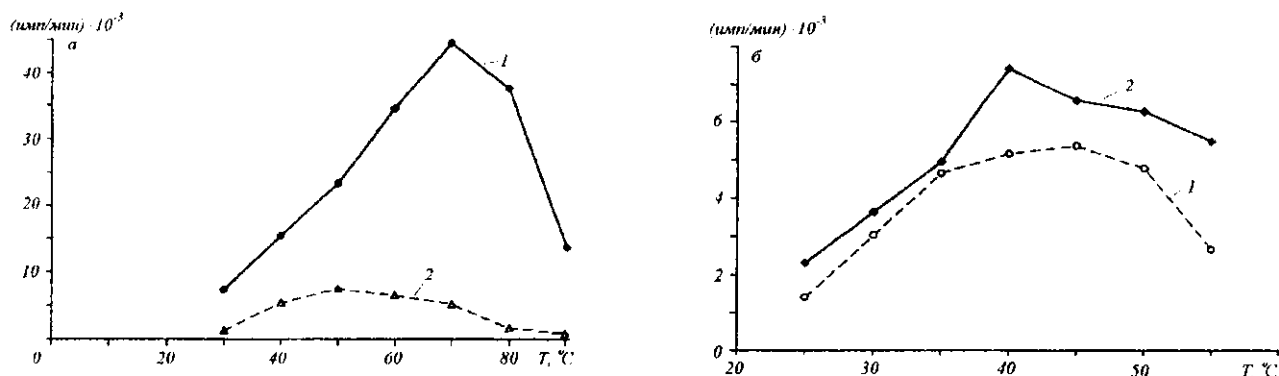


Рис. 3. Зависимость начальных скоростей образования тирозил-тРНК, катализируемых тирозил-тРНК синтетазами из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б), от температуры: 1 — тРНК из *T. thermophilus*; 2 — тРНК из *E. coli*

Таблица 1
Константы Михаэлиса для субстратов тирозил-тРНК синтетазы в реакциях аминокислотирования тРНК

Источник тирозил-тРНК синтетазы	Температура, °С	L-Тирозин		АТФ		тРНК ^{Тур} <i>T. thermophilus</i>		тРНК ^{Тур} <i>E. coli</i>	
		КМ, мкМ	V _{max} , моль/мин	КМ, мМ	V _{max} , моль/мин	КМ, мкМ	V _{max} , моль/мин	КМ, мкМ	V _{max} , моль/мин
<i>T. thermophilus</i>	37	7,81	4,05 · 10 ⁻⁷	0,08	6,4 · 10 ⁻⁷	0,55	4,4 · 10 ⁻⁷	0,85	4,3 · 10 ⁻⁷
	65	15,1	1,75 · 10 ⁻⁶	0,146	1,4 · 10 ⁻⁶	0,64	1,9 · 10 ⁻⁶	0,74	1,4 · 10 ⁻⁷
	75	—	—	0,142	1,4 · 10 ⁻⁶	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	37	27	—	0,4	—	—	> 0,1	—	—

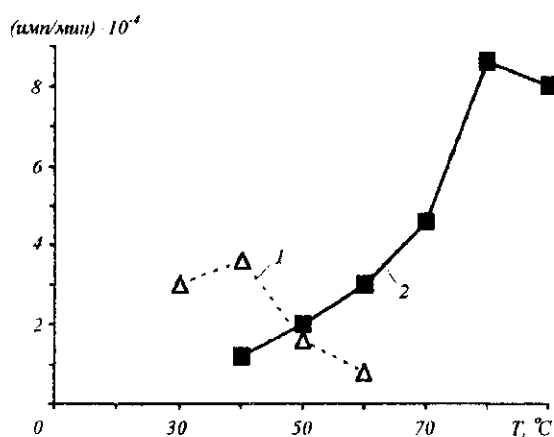


Рис. 4. Температурные зависимости скоростей пирогликолатного обмена для тирозил-тРНК синтетаз из *E. coli* (1) и *T. thermophilus* (2)

мента и ферментов *E. coli* следует отметить тот факт, что величины K_M для АТФ и аминокислоты в реакции аминокислотирования мезофильным ферментом в 5 и 3,5 раза соответственно выше аналогичных величин K_M для тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus*, что отражает повышенное сродство термофильного фермента к АТФ и аминокислоте.

Кроме того, с повышением температуры от 65 до 75 °С величина K_M для АТФ из термофильного фермента не менялась. Значения K_M для тРНК^{Тур} из *E. coli* и *T. thermophilus* в реакции аминокислотирования термофильным ферментом при 37 и 65 °С практически одинаковы. В то же время происходит увеличение V_{max} .

Известно, что большинство аминокислот-тРНК

синтетаз нестабильно при повышенной температуре. В качестве характеристики термостабильности ферментов могут служить константы термоинактивации [15, 16]. Мы установили, что температурный оптимум реакции пирогликолатного обмена находится в области 40 °С для мезофильного фермента и 81 °С — для термофильного (рис. 4).

Было также проведено сравнительное исследование кинетики тепловой инактивации тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli*. Тирозил-тРНК синтетазу из *T. thermophilus* термоинактивировали при 65, 71, 77, 85, 92 °С, а фермент из *E. coli* — при 30, 41, 44, 52 °С. Препараты фермента прогревали на водяной бане в течение 0, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 мин и измеряли остаточную активность в реакции пирогликолатного обмена. Результаты этих исследований приведены на рис. 5 (а, б) и в табл. 2.

Температурные зависимости скоростей пирогликолатного обмена, аминокислотирования и кривые термостабильности обоих ферментов представлены на рис. 6. Как видно, в случае мезофильного фермента в области повышенных температур наблюдается хорошая корреляция термостабильности и каталитической активности как в реакции пирогликолатного обмена, так и в реакции аминокислотирования. Падение каталитической активности после 41 °С и незначительную разницу между температурными оптимумами для гомологичной и гетерологичной тРНК^{Тур} в реакции аминокислотирования можно объяснить термоденатурацией фермента.

Совершенно другая картина наблюдалась в случае термофильного фермента. Вплоть до 81 °С фермент сохранял способность катализировать пирогликолатный обмен и, по крайней мере, вплоть до 65 °С обладал термостабильностью. В то же время уже после 75 °С отмечалось уменьшение скорости

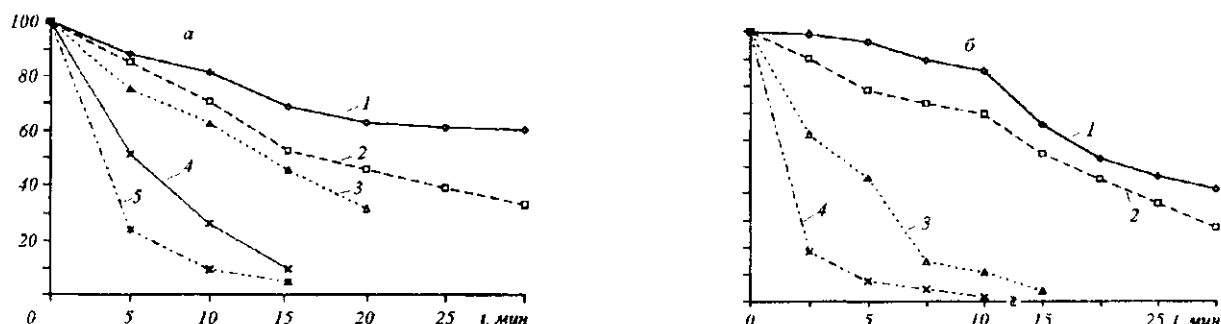


Рис. 5. Термоинактивация тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б) при температурах: а — 65 (1); 71 (2); 77 (3); 82 (4); 92 °С (5), б — 31 (1); 41 (2); 44 (3); 52 °С (4)

Таблица 2
Константы скорости термоинактивации тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli*

Источник тирозил-тРНК синтетазы	Температура, °С	K_t , мин ⁻¹
<i>T. thermophilus</i>	65	$2,38 \cdot 10^{-2}$
	71	3,73
	77	5,14
	85	14,26
	92	24
<i>E. coli</i>	30	2,05
	41	4,038
	44	15,3
	52	57,1

аминоацилирования тРНК^{Tyr}. Очевидно, причиной того, что скорость реакции аминоацилирования падает при температурах выше 75 °С является не термоинактивация тирозил-тРНК синтетазы, а термоденатурация тРНК.

Сравнивая кривые термостабильности и скорости пирофосфатного обмена, мы наблюдаем противоречивую картину: при достаточно быстром падении термостабильности фермента при повышении температуры от 65 до 92 °С скорость пирофосфатного обмена, катализируемого термофильной синтетазой, достигает оптимума при 81 °С и незначительно уменьшается (на 6 %) при 92 °С. Можно предположить, что в реакции пирофосфатного обмена при связывании фермента с АТР и аминокислотой происходит изменение конформации белка, ее стабилизация, что и является причиной увеличения активности фермента. Конформационные изменения в ферменте, стабилизирующие его структуру, при связывании с субстратом показаны в работе [17] для тирозил-тРНК синтетазы из *B. stearothermophilus*.

Были также проведены эксперименты по защите тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* в реакции термоинактивации при 77 °С термофильной и мезофильной суммарной тРНК. Результаты представлены на рис. 7. Добавление суммарной тРНК из *T. thermophilus* и *E. coli* в реакционную смесь позволяло ферменту сохранять 100 %-ю активность в последующей реакции пирофосфатного обмена в отличие от свободного фермента. В случае тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli* фермент мгновенно терял активность после инкубирования при 77 °С, несмотря на присутствие мезофильной или термофильной тРНК. Очевидно, что защита фермента тРНК возможна лишь в той температур-

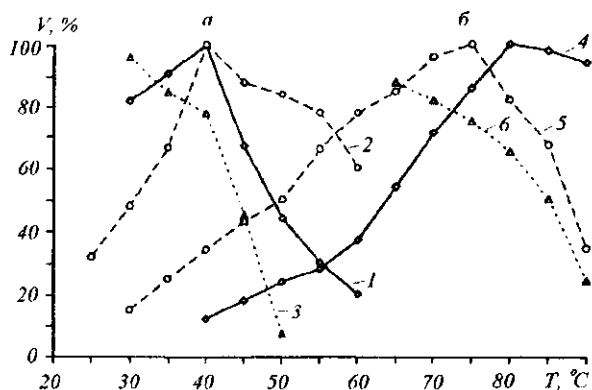


Рис. 6. Термостабильность и температурные зависимости скоростей реакций пирофосфатного обмена и аминоацилирования для тирозил-тРНК синтетаз из *E. coli* (а) и *T. thermophilus* (б): 1, 4 — скорость АТР-^[32P]пирофосфатного обмена; 2, 5 — скорость аминоацилирования тРНК; 3, 6 — термостабильность

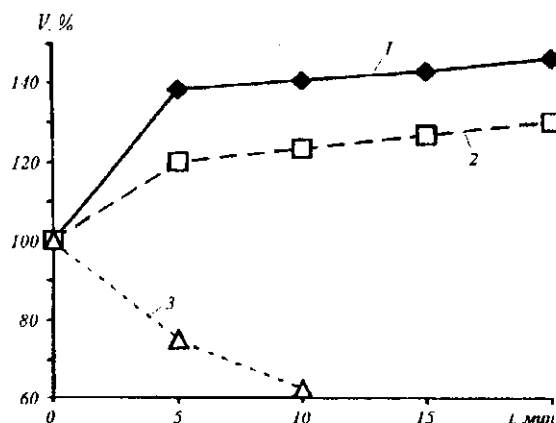


Рис. 7. Защита тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* от термоинактивации при 77 °С суммарной тРНК из *T. thermophilus* (1) и суммарной тРНК из *E. coli* (2); 3 — термоинактивация свободной тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* при 77 °С

ной області, где не происходило полной термоденатурации фермента и соответственно плавления тРНК.

Полученные результаты важны для понимания и оценки основных факторов термостабильности ферментов. Показано, что средство низкомолекулярных субстратов (L-тирозина и АТР) выше в случае термофильной тирозил-тРНК синтетазы по сравнению с мезофильной.

С другой стороны, сравнение кривых температурной зависимости термостабильности и пирофосфатного обмена тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* указывает на значительное увеличение термостабильности фермента в присутствии низкомолекулярных субстратов (L-тирозина и АТР). Это позволило нам предположить, что защита ферментов их гомологичными субстратами в клетках термофильных бактерий является одним из факторов, обеспечивающих их стабильность при высоких температурах. Проверка данного предположения является предметом наших дальнейших структурно-функциональных исследований ферментов из *T. thermophilus*.

С. П. Егорова, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Порівняльне вивчення фізико-хімічних властивостей тирозил-тРНК синтетаз із *Thermus thermophilus* і *Escherichia coli*

Резюме

У роботі порівняно фізико-хімічні властивості тирозил-

тРНК синтетаз (КФ 6.1.1.1) із *T. thermophilus* і *E. coli*. Визначено величини констант Міхаеліса для тРНК^{Тyr} із мезофіла і термофіла, L-тироzinу і АТР в реакціях аміноацлювання тирозил-тРНК синтетазою із *T. thermophilus* при 37, 65 і 75 °С, оптимальні концентрації КСl в реакціях перехресного аміноацлювання. Здійснено порівняльний аналіз амінокислотного складу термофільної і мезофільної тирозил-тРНК синтетаз. Отримано температурні залежності швидкостей реакцій АТР-[³²P]пірофосфатного обміну і аміноацлювання тРНК, температурні залежності термостабільності обох ферментів.

S. P. Egorova, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Comparative study of the physical and chemical properties of the tyrosyl-tRNA synthetases from *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli*

Summary

A comparative study of the physical and chemical properties of the tyrosyl-tRNA synthetases from *T. thermophilus* and *E. coli* has been carried out. K_M values for tRNA^{Tyr} from *T. thermophilus* and *E. coli*, for L-tyrosine and ATP, as well as their temperature dependences were determined. The KCl effects were studied for the aminoacylation of the homologous tRNA^{Tyr} and heterologous tRNA^{Tyr} species. A comparative analysis of amino acid composition of the tyrosyl-tRNA synthetases from *T. thermophilus* and *E. coli* has been carried out. Temperature dependences of tRNA aminoacylation and [³²P]PPi-ATP exchange rates and the thermostability curves for tyrosyl-tRNA synthetases from *T. thermophilus* and *E. coli* were determined.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Яремчук А. Д., Тукало М. А., Егорова С. П. и др. Выделение тирозил-тРНК синтетазы из *Thermus thermophilus* НВ-27 // Укр. биохим. журн.—1990.—62, № 2.—С. 97—99.
2. Calendar R., Berg P. Purification and physical characterization of tyrosyl ribonucleic acid synthetases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Biochemistry.—1966.—5, N 5.—P. 1681—1690.
3. Calendar R., Berg P. The catalytic properties of tyrosyl ribonucleic acid synthetases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Ibid.—P. 1690—1695.
4. Jakes R., Fersht A. R. Tyrosyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. Stoichiometry of ligand binding and half-of-the-sites reactivity in aminoacylation // Ibid.—1975.—14, N 15.—P. 3344—3357.
5. Koch G. L. E. Tyrosyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*. Preparation and properties of the crystallizable enzyme // Ibid.—1974.—13, N 11.—P. 2307—2312.
6. Bhat T. N., Blow D. M., Brick P., Nyborg J. Tyrosyl-tRNA synthetase forms a mononucleotide-binding fold // J. Mol. Biol.—1982.—158, N 2.—P. 699—709.
7. Brick P., Bhat T. N., Blow D. M. Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate // Ibid.—1989.—208, N 1.—P. 83—98.
8. Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1962.—8, N 1.—P. 1—3.
9. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики.—М.: Мир, 1979.—280 с.

10. *Leatherbarrow R. J.* Using linear and non-linear regression to fit biochemical data // *Trends Biochem. Sci.*—1990.—15.—P. 455—458.
11. *Bobkova E. V., Gedrovitch A. V., Ankilova V. N. et al.* Comparative study of the phenylalanyl-tRNA synthetases from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* by the tritium topography method // *Biochem. Int.*—1990.—20, N 5.—P. 1001—1009.
12. *Fujinaga M., Berthet-Colominas C., Yaremchuk A. D. et al.* Refined crystal structure of the seryl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* at 2.5 Å resolution // *J. Mol. Biol.*—1993.—234, N 1.—P. 222—233.
13. *Wrba A., Schweiger A., Schultes V. et al.* Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium *Thermotoga maritima* // *Biochemistry.*—1990.—29, N 33.—P. 7584—7592.
14. *Ankilova V. N., Reshetnikova L. S., Chernaya M. M., Lavrik O. I.* Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* HB 8. Purification and properties of the crystallizing enzyme // *FEBS Lett.*—1988.—227, N 1.—P. 9—13.
15. *Chlumecka V., Mitra S. K., D'Obrenan P., Smith C. J.* Differences in the thermal inactivation properties of lysyl and arginyl transfer ribonucleic acid synthetases of bakers' yeast // *J. Biol. Chem.*—1970.—245, N 9.—P. 2241—2246.
16. *Tscherne J. S., Lanks K. W., Salim P. D. et al.* Studies on rat liver phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetase. Further purification, substrate specificity, and effects of substrates on heat inactivation // *Ibid.*—1973.—248, N 11.—P. 4052—4059.
17. *Fersht A. R., Knill-Jones J. W., Bedouelle H., Winter G.* Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase; a mobile loop envelops the transition state in an induced-fit mechanism // *Biochemistry.*—1988.—27.—P. 1581—1587.

Поступила в редакцию 17.07.97