

## Trp144 как флуоресцентный зонд для изучения конформационной подвижности С-модуля эукариотической тирозил-тРНК синтетазы

М. А. Кордыш, К. А. Одынец, А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*Получены спектры флуоресценции С-модуля тирозил-тРНК синтетазы. Используя методы флуоресцентной спектроскопии и компьютерного моделирования, впервые охарактеризовано микроокружение остатка триптофана. Быстрая конформационная динамика С-модуля в наносекундном временном интервале определена с помощью тушения флуоресценции С-модуля акриламидом и ионами Cs<sup>+</sup>.*

---

**Введение.** Тирозил-тРНК синтетаза млекопитающих состоит из двух структурных модулей: каталитического NH<sub>2</sub>-концевого модуля и COOH-концевого цитокинподобного модуля, имеющего сродство к тРНК и выполняющего некаталитическую цитокиновую функцию после протеолитического отщепления от каталитического ядра синтетазы [1, 2]. Две альтернативные функции С-модуля могут реализовываться в разных конформациях белка. Одним из наиболее информативных методов изучения конформационных особенностей и внутримолекулярной динамики белков является флуоресцентная спектроскопия [3—5]. Собственная флуоресценция белков обусловлена, в основном, остатками триптофана, которые являются зондами в пространственной структуре белка. Благодаря этим зондам можно получить информацию о свойствах микроокружения флуорофора, о динамике белка в растворе, осуществить мониторинг конформационных изменений белка, имеющих функциональное значение. Для изучения конформационных изменений С-модуля в растворе в работе охарактеризована собственная флуоресценция С-модуля и проанализирована его внутримолекулярная динамика методами флуоресцентной спектроскопии.

**Материалы и методы.** Объект исследований — С-модуль тирозил-тРНК синтетазы — был экспрессирован в клетках *Escherichia coli* и очищен до

гомогенного состояния (95 %) металхелатирующей хроматографией согласно [6].

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре «Model 850» («Hitachi», Япония).

Эксперименты выполняли при термостатировании с помощью хромель-алюмелевой термопары при температуре 25 °С с точностью ± 0,2 °С.

Ширина щели для монохроматора возбуждающего света составляла 5 нм. Длина волны возбуждающего света при изучении белковой флуоресценции равнялась 280 или 296 нм, ее определяли с точностью до ± 0,1 нм.

Спектры флуоресценции записывали с помощью автоматического сканирования в интервале длин волн 300—400 нм. Скорость сканирования составляла 30—60 нм/мин.

Во всех случаях измерение спектров проводили в режиме сравнения. Геометрическая ширина щели для монохроматора регистрирующей системы была равна 5 нм. Это позволило исключить влияние комбинационного рассеяния света в спектрах флуоресценции. Разрешение в полученных спектрах флуоресценции составляло 0,2 нм.

Флуоресценцию измеряли в кварцевых прямоугольных кюветах с длиной оптического пути 0,5 см. Объем исследуемых растворов составлял 0,1—0,15 мл. Кюветы помещали в термостатируемый кюветодержатель. Флуоресценцию регистрировали под углом 90° к направлению пучка воз-

буждающего света. Для снижения влияния случайных факторов спектры определяли не менее 3 раз. Воспроизводимость спектров флуоресценции по интенсивности в максимуме была не менее 98—99 %.

Измерение спектров флуоресценции С-концевого модуля тирозил-тРНК синтетазы проводили в 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ NaCl. Перед приготовлением раствора используемый буфер проверяли на отсутствие флуоресцирующих примесей, записывая спектр флуоресценции. Каких-либо примесей, флуоресцирующих в исследуемом спектральном диапазоне 300—400 нм, в буферных растворах не обнаружено.

Перед измерением спектров флуоресценции исследуемого белка записывали его спектры поглощения на двухканальном спектрофотометре «Spectord UV VIS» (ГДР). Использовали кварцевые микрокюветы с длиной оптического пути 0,5 см, объем исследуемого образца составлял 0,2—0,4 мл. Спектры поглощения записывали в УФ области.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм с учетом длины оптического пути и коэффициента экстинкции белка ( $E_{280}^M = 9650 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ;  $A_{280}^{1 \text{ мг/мл}} = 0,398$ ).

В опытах по тушению флуоресценции ионными тушителями готовили серию растворов белка с изменяющейся концентрацией тушителя от 0 до 0,3 М. Измеренные значения интенсивностей флуоресценции образцов белка с тушителями корректировали на коэффициент разбавления и экранирования [7] добавляемых в раствор реагентов.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены спектры флуоресценции С-концевого модуля тирозил-тРНК синтетазы при температуре 25 °С и длинах волн возбуждения 280 и 296 нм. Различие спектров, возбуждаемых при 280 и 296 нм, обусловлено вкладом тирозиновой флуоресценции при возбуждении длиной волны 280 нм. Спектр тирозиновой флуоресценции, полученный при вычитании нормированных при 370 нм спектров, возбуждаемых при 280 и 296 нм, имеет положение максимума при 305 нм, а вклад тирозиновой флуоресценции в общий спектр излучения белка составляет около 10 %.

В структуре С-модуля тирозил-тРНК синтетазы [8] содержатся один остаток триптофана (Trp144) и три остатка тирозина (Tyr27, Tyr111, Tyr140). Собственная флуоресценция белка при длине волны возбуждения 296 нм обусловлена флуоресценцией остатка Trp144.

Для выяснения локализации остатка триптофана в С-модуле по данным флуоресценции использована модель дискретных структурно-физиче-

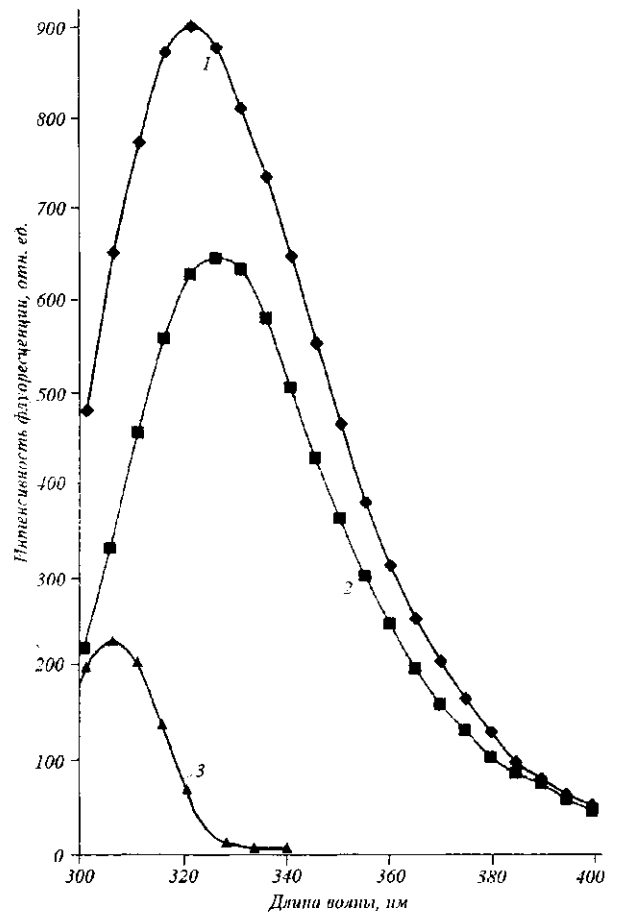


Рис. 1. Спектры флуоресценции С-модуля тирозил-тРНК синтетазы при длине волны возбуждения 280 нм (1), 296 нм (2) и разностный спектр (1—2) тирозиновой флуоресценции (3)

ских классов триптофанов в белке, предложенная Бурштейном [9]. Анализ положения максимума и ширины спектров триптофановой флуоресценции исследуемого белка показал, что Trp144 относится к классу I модели Бурштейна и соответствует внутренним остаткам триптофана, экранированным в белковой глобуле:

Параметр	$\lambda_{\text{ex}} = 296 \text{ нм}$
Положение максимума спектра ( $\lambda_{\text{max}}$ , нм)	327
Ширина спектра ( $\Delta\lambda$ , нм)	49
Квантовый выход ( $q$ )	0,09

Положение максимума спектра флуоресценции белка обусловлено гидрофобным микроокружением остатка Trp144, а также замедленной релаксацией окружения.

В работе визуализировано (рис. 2) и проанали-

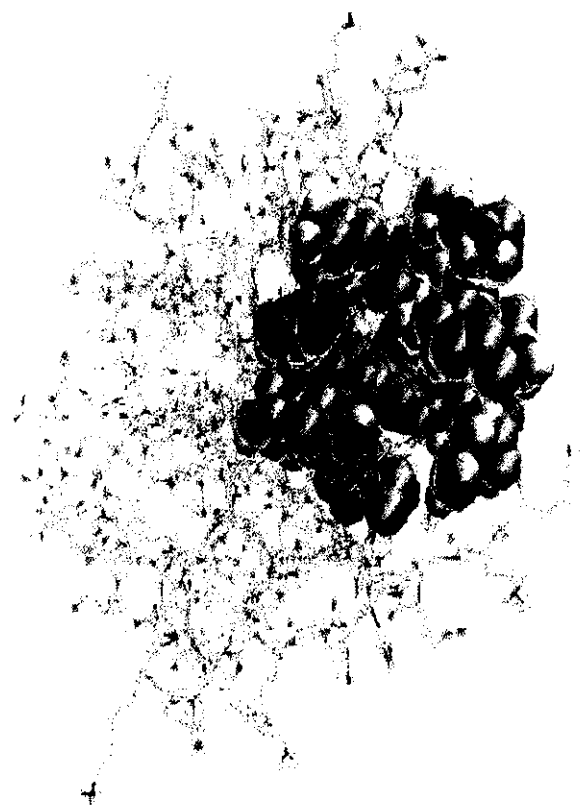


Рис. 2. Микроокружение остатка Trp144 С-модуля тирозил-тРНК синтетазы

зировано окружение остатка Trp144 С-концевого модуля тирозил-тРНК синтетазы в сфере с радиусом 5 Å (в центре которой расположен Trp144) с помощью программы SwissPDB-Viewer 3.7(b2). В заданной области вокруг Trp144 находятся 16 аминокислотных остатков: восемь гидрофобных (Val2, Ile3, Pro4, Val108, Leu130, Phe134, Ala142, Phe149) и восемь гидрофильных (Tyr111, Asp133, Lys135, Gln143, Lys145, Gln146, Thr147, Asn148). Анализируя окружение Trp144, следует выделить отрицательно заряженную группу COO<sup>-</sup> Asp133, а также две положительно заряженные группы NH<sub>3</sub><sup>+</sup> Lys135 и Lys145. В рассматриваемом окружении Trp144 важно отметить наличие семи тушащих контактным способом аминокислотных остатков [10]: Tyr111, Asp133, Lys135, Gln143, Lys145, Gln146, Asn148, а также присутствие 12 молекул воды, которые могут контактировать с остатком Trp144.

Проведенный расчет экспонированности остатка Trp144 в С-концевом модуле тирозил-тРНК синтетазы с помощью программы SwissPDB-Viewer 3.7(b2) обнаружил 1–2 %-ю экспонированность Trp144. В то же время максимум триптофановой

флуоресценции в данном белке находится на 327 нм, что, по теории Бурштейна, также свидетельствует о внутреннем экранированном положении остатка Trp144 в белке.

Тушение триптофановой флуоресценции в белках может происходить при контакте триптофана с тушащими боковыми цепями некоторых аминокислот (Cys, Asp, Gly, His, Lys, Asn, Gln, Tyr), а также с молекулами воды [10].

Для изучения доступности остатка Trp144 в белковой глобуле С-модуля мы использовали метод тушения флуоресценции белка внешними тушителями (акриламид, Cs<sup>+</sup>). Обнаружено, что при добавлении акриламида или ионов Cs<sup>+</sup> к растворам исследуемого белка происходит тушение триптофановой флуоресценции. Полученные кривые тушения флуоресценции С-модуля акриламидом и Cs<sup>+</sup> представлены на рис. 3 в виде зависимости относительной интенсивности флуоресценции  $I_0/I$  от концентрации тушителя (акриламида или Cs<sup>+</sup>) ( $I_0$  — начальная интенсивность свечения;  $I$  — истинная интенсивность флуоресценции, соответствующая данной концентрации тушителя). Эффективность тушения характеризовали отношением максимального изменения интенсивности флуоресценции  $\Delta I_N = I_0 - I_N$  к начальной интенсивности свечения  $I_0$ . Выявлено, что остаток Trp144 является доступным для тушителей, а максимальное тушение флуоресценции С-модуля в присутствии акриламида и Cs<sup>+</sup> равно 38 и 21 % соответственно.

Внутренние области белков обычно рассматриваются как неполярные [11]. Поскольку, как уже упоминалось выше, триптофан лишь на 1–2 % экспонирован, следует ожидать, что этот остаток будет почти недоступным для тушителей во внешней водной фазе. Однако сравнение тушения нейтральным тушителем акриламидом и заряженным тушителем Cs<sup>+</sup> свидетельствует о частичной доступности Trp144 для молекул тушителей, что может быть обусловлено наличием внутримолекулярной динамики в белковой глобуле. Известно, что акриламид тушит предпочтительно экспонированные остатки триптофана, но вместе с тем он может проникать и в белковые матрицы. Линейный характер представленных на рис. 3 кривых тушения указывает на динамический характер тушения триптофановой флуоресценции [11]. Динамическое тушение флуоресценции определяется частотой столкновений между флуорофором и тушителем. Аминокислотные остатки плотно упакованы, так что внутри молекулы белка нет свободного пространства для молекулы, подобной акриламиду. Однако тушение акриламидом флуоресценции остатка Trp144 в исследуемом белке указывает на то,

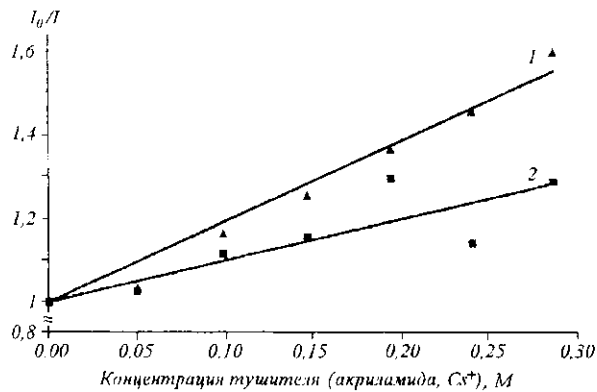


Рис. 3. Тушение флуоресценции С-модуля в присутствии акриламида (1), ионов  $\text{Cs}^+$  (2). Концентрация С-модуля 0,377 мг/мл ( $2,46 \cdot 10^{-5}$  М)

что тушители диффундируют сквозь белковую матрицу. Для объяснения такой диффузии можно предположить, что белковая матрица флуктуирует в наносекундном временном диапазоне, обеспечивая проникновение молекул тушителя. Как указано выше, максимальное тушение флуоресценции для акриламида составляет 38 %, а для ионов  $\text{Cs}^+$  — 21 %. Более слабое тушение ионами  $\text{Cs}^+$  можно объяснить тем, что заряженные ионы вообще плохо проникают внутрь белка. Кроме того, нужно учесть наличие положительно заряженных групп Lys135 и Lys145 в ближайшем окружении триптофана, что приводит к электростатическому отталкиванию катионов  $\text{Cs}^+$ .

**Выводы.** Анализируя полученные данные, касающиеся спектров флуоресценции С-модуля, тушения его флуоресценции, а также результатов компьютерного моделирования, можно сделать вывод о том, что остаток триптофана в молекуле исследуемого белка в значительной степени экранирован. В то же время остаток Trp144 является частично доступным для внешних тушителей флуоресценции, что свидетельствует о диффузии тушителя сквозь белковую матрицу благодаря ее флуктуациям, т. е. о наличии быстрой внутримолекулярной динамики белка в наносекундном временном диапазоне.

M. A. Kordysh, K. A. Odynets, A. I. Kornelyuk

Trp144 as a fluorescence probe for investigation of the C-module rapid conformation dynamics in eukaryotic tyrosyle-tRNA synthetase

Summary

The spectra of fluorescence of the tyrosyle-tRNA synthetase C-

module have been obtained. The microsurrounding of a tryptophan residue has been characterized using the methods of fluorescence spectroscopy and computational modeling. The rapid conformation dynamics of the C-module in nanosecond time scale is revealed using the fluorescence quenching with acrylamide and  $\text{Cs}^+$  ions.

M. A. Kordysh, K. A. Odynets, O. I. Kornelyuk

Trp144 як флуоресцентний зонд для вивчення конформаційної рухливості С-модуля еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази

Резюме

Одержано спектри флуоресценції С-модуля тирозил-тРНК синтетази. Використовуючи методи флуоресцентної спектроскопії та комп'ютерного моделювання, вперше охарактеризовано мікросередовище залишку триптофану. Швидку конформаційну динаміку С-модуля в наносекундному часовому інтервалі визначено за допомогою гасіння флуоресценції С-модуля акриламідом та іонами  $\text{Cs}^+$ .

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kornelyuk A. I. Структурно-функціональне дослідження тирозил-тРНК синтетази млекопитаючих // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 4.—С. 349—359.
2. Kornelyuk A. I., Maarten P. R. T., Dubrovsky A. L., Murray J. C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 2.—Р. 168—172.
3. Демченко А. П. Люминесценция и динамика белков.—Киев: Наук. думка, 1988.—418 с.
4. Демченко А. П. Равновесная внутримолекулярная подвижность в белках // Укр. биохим. журн.—1981.—53, № 4.—С. 114—128.
5. Демченко О. П., Воловик З. М. Внутримолекулярна динаміка і функція білків // Вісн. АН УРСР.—1988.—№ 2.—С. 34—41.
6. Дубровський А. Л., Савинская Л. А., Корнелюк А. И. Клонирование и бактериальная экспрессия цитокиноподобного некаталитического домена бычьей тирозил-тРНК синтетази // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 5.—С. 449—452.
7. Ehrenberg M., Cronvall E., Rigler R. Fluorescence of proteins interacting with nucleic acids: Correction for light absorption // FEBS Lett.—1971.—18, N 2.—Р. 199—203.
8. Голуб А. Г., Одынец К. А., Ныпорко А. Ю., Корнелюк А. И. Моделирование пространственной структуры СООН-концевого цитокиноподобного модуля цитоплазматической тирозил-тРНК синтетази быка // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 6.—С. 515—523.
9. Веденкина Н. С., Буриштейн Э. А. Триптофановая флуоресценция белков в растворах. Положение максимума спектра флуоресценции // Молекуляр. биология.—1970.—№ 4.—С. 743—748.
10. Chen Y., Liu B., Yu H.-T., Barkley M. D. The peptide bond quenches indole fluorescence // J. Amer. Chem. Soc.—1996.—N 118.—Р. 9271—9278.
11. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.—М.: Мир, 1986.—496 с.

УДК 577.152.611

Надійшла до редакції 11.11.02