

Дослідження взаємодії ізольованого С-модуля тирозил-тРНК синтетази з тРНК методом флуоресцентної спектроскопії

М. О. Кордиш, О. І. Корнелюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

kordysh_m@yahoo.com

Некаталітичний С-модуль тирозил-тРНК синтетази ссавців має подвійну функцію: бере участь у зв'язуванні тРНК як цис-фактор та після протеолітичного відщеплення від каталітичного кора синтетази проявляє цитокінову активність подібно до цитокіну ЕМАР II. С-модуль TyrRS містить залишок триптофану Trp144, який є флуоресцентним зондом у структурі білка, однак локалізований поза сайтом зв'язування РНК. Для дослідження взаємодії ізольованого С-модуля з тРНК консервативний ароматичний залишок Phe127 у РНК-зв'язувальному центрі методами сайт-спрямованого мутагенезу було замінено на флуорофор Trp127. Це дозволило суттєво підвищити квантовий вихід флуоресценції білка та визначити параметри зв'язування С-модуля з тРНК. На основі даних спектрофлуориметричного титрування визначено величину константи дисоціації комплексу С-модуля з тРНК^{Phe}, яка складає $2,9 \cdot 10^{-8}$ М, та стехіометрію комплексу ($n = 1,2$).

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, мутагенез, флуоресценція.

Вступ. Аміноацил-тРНК синтетази каталізують високоспецифічне аміноацилювання гомологічних тРНК у процесі біосинтезу білка. Однією з найвивченіших АРСаз ссавців є цитоплазматична тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS) [1–3]. Цей фермент складається з двох структурних модулів: NH₂-кінцевого каталітичного модуля та цитокінподібного COOH-кінцевого модуля — гомолога цитокіну ЕМАР II (ендотеліального та моноцитактивуючого поліпептиду II). Некаталітичний С-модуль цитоплазматичної TyrRS ссавців виконує подвійну функцію: бере участь у зв'язуванні тРНК як цис-фактор та після протеолітичного відщеплення від каталітичного кора синтетази виявляє цитокінову активність, подібну до ЕМАР II [4, 5]. Еукаріотні

АРСази, як правило, використовують тРНК-зв'язувальні фактори (tIF) в цис- чи транс-положенні відносно каталітичного ядра синтетази, причому ці фактори можуть неспецифічно взаємодіяти з різними тРНК [6, 7].

С-модуль та ЕМАР II належать до групи тРНК-зв'язувальних факторів, до складу яких входить ОВ-фолд. Їхніми представниками також є окремий білок Trbp111 у бактерій [8] та Arc1p-білок у дріжджів [7]. У ссавців мультисинтетазний комплекс включає окремий білок р43, який є попередником цитокіну ЕМАР II [9]. Усі ці білки у своїй структурі містять ОВ-фолд як домен, характерною властивістю якого є зв'язування з нуклеїновими кислотами. Архітектура багатьох білків базується на закритих β-барелях, одним з яких є 5-стрендовий ОВ-фолд, вперше описаний Мурзінім

у 1993 році як олігонуклеотид(олігосахарид)-зв'язувальний структурний мотив [10].

На цей час у базі даних просторових структур PDB налічується 85 різноманітних ОВ-фолд-вмісних білків. Найбільшою групою серед них є білки, що зв'язують нуклеїнові кислоти, серед них родина антикодон-зв'язувальних доменів, до якої належать AspRS, AsnRS і LysRS (N-кінцеві домени яких є типовими ОВ-фолдами та беруть участь у впізнанні антикодонів гомологічних тРНК [11]), та родина Муф-доменив, до складу якої входять ЕМАР II, С-модуль TyrRS ссавців, Arg1p-білок дріжджів, білок Trbp111 і В2-домен PheRS бактерій.

Варто зазначити, що структурні аспекти взаємодії ізольованого С-модуля TyrRS з тРНК, а також роль окремих амінокислотних залишків поки що залишаються невивченими. Раніше нами проведено дослідження власної триптофанової флуоресценції та конформаційної рухливості ізольованого С-модуля TyrRS [12, 13] і цитокіну ЕМАР II [14, 15] з використанням Trp144 у С-модулі та Trp125 у ЕМАР II як флуоресцентних зондів у структурі цих білків.

Мета цієї роботи полягала у вивченні взаємодії С-модуля TyrRS і цитокіну ЕМАР II з тРНК методами флуоресцентної спектроскопії. У попередніх експериментах нами показано, що взаємодія С-модуля з тРНК супроводжується сильною агрегацією білка в розчині і це суттєво впливає на визначення параметрів зв'язування. У зв'язку з цим в представленій роботі для підвищення квантового виходу флуоресценції С-модуля TyrRS і зниження робочих концентрацій білка методами сайт-спрямованого мутагенезу консервативний ароматичний залишок Phe127 у РНК-зв'язувальному центрі було замінено на флуорофор Trp127. Це дало можливість провести коректні дослідження взаємодії С-модуля з тРНК методом флуоресцентної спектроскопії та визначити параметри зв'язування, а також перевірити гіпотези щодо механізму взаємодії індольного кільця Trp127 з РНК при утворенні комплексу.

Матеріали і методи. Рекombінантні білки С-модуль TyrRS та ЕМАР II були експресовані у клітинах *Escherichia coli* та очищені до гомогенного стану (95 %) за допомогою металхелатуючої хроматографії згідно з [16]. Після виділення рекombінантних білків послідовність His-Tag відщеплювали за допомогою ентерокінази (enterokinase, light chain) («BioLabs», США).

Для дослідження комплексів білків з нуклеїновою кислотою розчини білків і тРНК^{Phe} («Sigma», США) готували в буфері, який вміщував 20 мМ трис-НСІ, рН 7,7, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂.

Концентрації білків і тРНК^{Phe} визначали спектрофотометрично, застосовуючи такі коефіцієнти екстинкції:

для С-модуля $\epsilon_{280} = 9650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

для мутантного С-модуля (Phe127Trp) $\epsilon_{280} = 15470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

для ЕМАР II $\epsilon_{280} = 8480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

для тРНК^{Phe} $\epsilon_{260} = 500000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

УФ-поглинання вимірювали з використанням спектрофотометра Specord UV VIS («Carl Zeiss Jena», Німеччина). Заміну залишку Phe127 на Trp127 в С-модулі TyrRS здійснювали сайт-спрямованим мутагенезом за допомогою методу Quik-Change, розробленого фірмою «Stratagene» (США), з використанням праймерів F488WS і F488WAs:

F488WS 5'-caagaagaaagtctgggagaaattgcagggc-3';
F488WAs 5'-gcctgcaatttctcccagactttctcttg-3'.

Реакційна суміш для проведення ПЛР містила 1 × Pfu-буфер («Fermentas», Литва), 0,2 ммоль dNTPs («Амплиценс», Росія), праймери F488WS і F488WAs (по 20 пмоль), 50—100 нг плазмиди *pKCTD*, 2,5 од. акт. Pfu ДНК-полімерази. Об'єм реакційної суміші доводили деіонізованою водою до 50 мкл. Початкову денатурацію матриці проводили протягом 1 хв за температури 94 °С. Далі здійснювали 35 циклів за такою програмою: денатурація матриці упродовж 1 хв за температури 94 °С, відпал праймерів — 1 хв, 60 °С; добування праймерів — 6 хв, 72 °С. Після закінчення реакції зразок інкубували додатково (6 хв, 72 °С).

Продукт ПЛР розщеплювали за допомогою рестриктази *DpnI* («Fermentas») за температури 37 °С протягом ночі. При цьому реакційна суміш містила реакційний буфер рестриктази *DpnI* та 20 од. акт. ферменту.

Для трансформації 200 мкл компетентних клітин *E. coli* DH5a використовували 5—10 мкл продуктів рестрикції.

Ефективність сайт-спрямованого мутагенезу із заміною Phe127 на Trp127 перевіряли за допомогою секвенування плазмидної ДНК.

Структури С-модуля та мутанта із заміною Phe127 на Trp127 візуалізували, використовуючи програму SwissPDB-Viewer 3.7 (b2) на основі моделі просторової структури С-модуля sm5 [17].

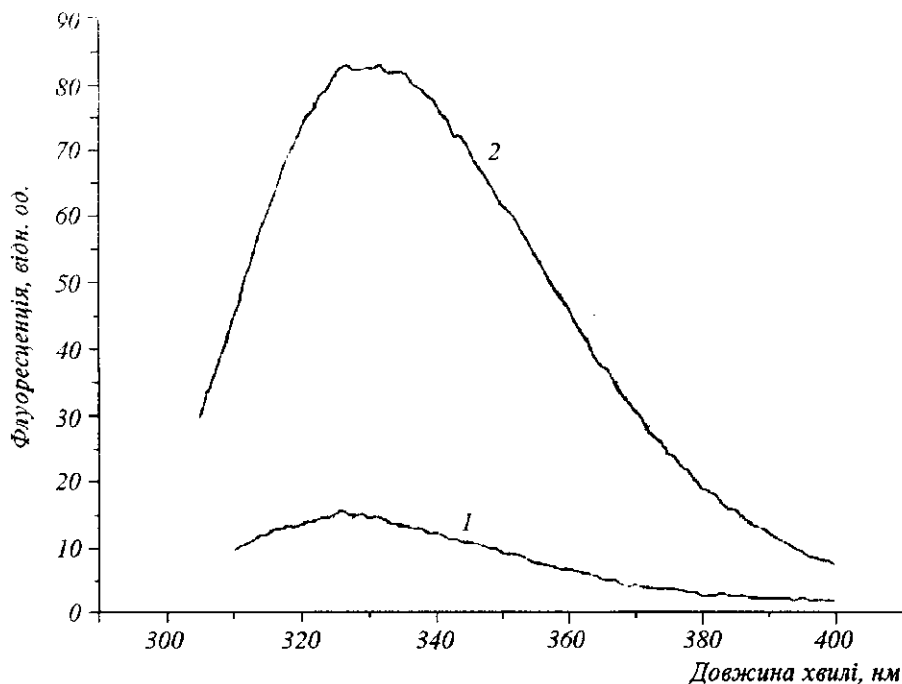


Рис. 1. Спектр власної триптофанової флуоресценції нативного С-модуля до мутації Phe127Trp (1) та після заміни Phe127 на Trp (2) при збудженні флуоресценції на довжині хвилі 296 нм

Флуоресцентні вимірювання здійснювали на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian Inc., Mulgrave, Австралія). Ширина щілини монохроматора збуджуючого світла становила 5 нм. Довжина хвилі збудження — 296 нм. Величини інтенсивностей флуоресценції білка під час титрування тРНК^{Phe} коригували на розведення (K_p), флуоресценцію буфера та поглинання нуклеїнових кислот — при довжині хвилі 296 нм (A_{296}). Коефіцієнт корекції на розведення визначали як $K_p = V/V_0$, де V_0 — початковий об'єм білка; V — об'єм розчину білка після додавання тРНК^{Phe}. Коефіцієнт корекції на поглинання тРНК — $10^{A_{296} \cdot L/2}$, де L — довжина оптичного шляху кювети.

Параметри зв'язування білків з тРНК визначали за допомогою рівняння (1) [18]:

$$a(P_0, L, K_d, n, \Phi) = 1 - \Phi \times \left[\frac{(n \cdot K_d + n \cdot P_0 + L)}{2nP_0} - \frac{\sqrt{(n \cdot K_d + n \cdot P_0 + L)^2 - (4n \cdot P_0 \cdot L)}}{2nP_0} \right], \quad (1)$$

де $a = I^{340}/I_0^{340}$; $\Phi = 1 - I_{\text{наситення}}^{340}/I_0^{340}$; I_{340} — інтенсивність флуоресценції білка за присутності тРНК в концентрації L ; I_0^{340} — початкова інтенсивність флуоресценції білка; $I_{\text{наситення}}^{340}$ — інтенсивність флуоресценції білка за присутності тРНК при на-

сиченні; P_0 — загальна концентрація білка в розчині; K_d — константа дисоціації комплексу; n — стехіометрія зв'язування.

Для отримання числових значень K_d та n використовували імовірнісний метод мінімуму χ^2 . Функція χ^2 узгоджує експериментальні дані $a = I^{340}/I_0^{340}$ з модельними $a(P_0, L, K_d, n, \Phi)$ (рівняння 1), де Φ проявляє тенденцію до росту в разі погіршення узгодження. Рівняння для функції χ^2 :

$$\chi_{sqR}(K_d, n, \Phi) = \frac{1}{pts - 2} \cdot \sum_{i=1}^{pts-1} \times \frac{(a(P_0e_i, L, K_d, n, \Phi) - aexp_i)^2}{\sigma^2}, \quad (2)$$

де pts — кількість експериментальних точок a ; σ^2 — стандартне відхилення величини a . Програму Mathcad 2003 Professional і команду Minimize використано для знаходження мінімуму функції χ_{sqR} при певних значеннях K_d та n , які було необхідно визначити.

Результати і обговорення. Ізольований С-модуль TrpRS містить один залишок триптофану Trp144, який локалізований в А-субдомени модуля. Спектр триптофанової флуоресценції нативного С-модуля має максимум емісії при 327 нм (рис. 1, спектр 1), що відповідає внутрішньоглобулярній

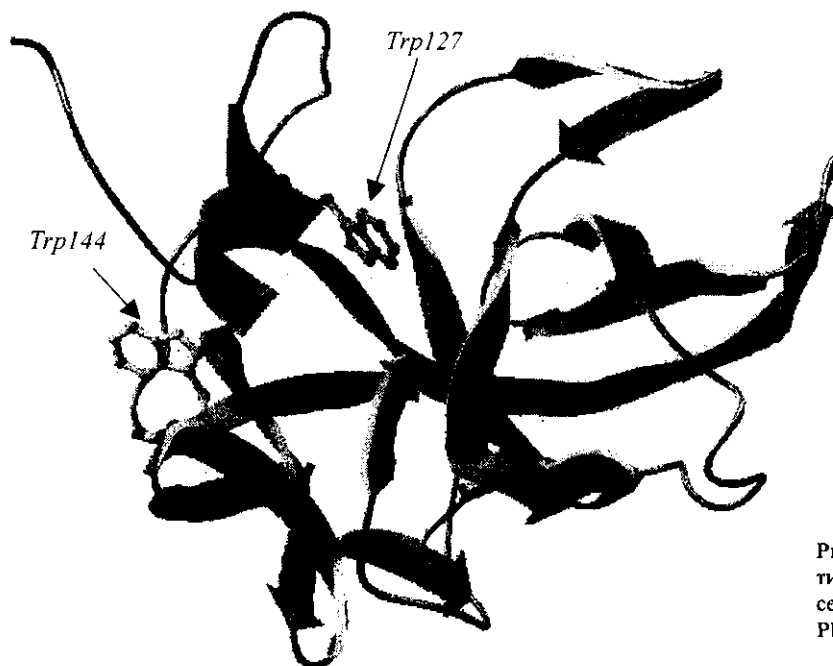


Рис. 2. Просторова структура С-модуля тирозил-тРНК синтетази із заміною консервативного ароматичного залишку Phe127 на Trp

локалізації флуорофору та його екранованому стану в структурі білка [12]. Проведені нами раніше [12, 13] дослідження власної триптофаної флуоресценції та конформаційної рухливості С-модуля з використанням Trp144 як флуоресцентного зонда показали високу чутливість до локальних конформаційних змін у його мікрооточенні. Проте Trp144 локалізований поза межами РНК-зв'язувального сайту С-модуля, який забезпечує структурно-специфічне зв'язування різних тРНК. Вірогідний РНК-зв'язувальний сайт нами було ідентифіковано раніше на основі даних футпринтингу нуклеазами ChS, Rp, V1 і PfuM та іонами Pb^{2+} , а також комп'ютерного макромолекулярного докину С-модуля і тРНК^{Phe} [19].

Потенційна РНК-зв'язувальна поверхня включає залишки конекторної петлі між двома стрендами OB-фолду (L426-G433, K435-Q437), міждоменний інтерфейс (E480-L481), лізин-багатий кластер $K_{482}PKKK_{486}$ та амінокислотні залишки E489-K490 α -спіралі А-субдомену [19]. В попередніх експериментах з вивчення взаємодії С-модуля з тРНК нами показано, що ця взаємодія супроводжується сильною агрегацією білка в розчині, причому агрегація індукується саме присутністю поліаніонної структури РНК (М. Кордиш, неопубліковані результати). Очевидно, що наявність процесу агрегації суттєво впливає на коректність визначення параметрів зв'язування в експериментах з флуориметричного титрування білка лігандами. Тому для

підвищення квантового виходу флуоресценції С-модуля TyrRS і проведення коректних досліджень взаємодії білка з тРНК методами сайт-спрямованого мутагенезу нами було замінено консервативний ароматичний залишок Phe127 на флуорофор Trp127. Останній локалізований в межах РНК-зв'язувального центра поряд з лізин-багатим кластером KPKKK. Слід відзначити, що в цьому ж положенні поліпептидного ланцюга гомологічного білка — цитокіну ЕМАР II міститься залишок Trp [20].

На рис. 1 (спектр 2) наведено спектр триптофаної флуоресценції мутантного С-модуля із заміною Phe127 на Trp127 при довжині хвилі збудження флуоресценції 296 нм, що є умовою збудження лише триптофаної флуоресценції в білках [18, 21]. Максимум спектра флуоресценції мутантного С-модуля знаходиться на 332 нм і є суттєво зсунутим у довгохвильову спектральну область порівняно з нативним С-модулем, оскільки обумовлений як залишком Trp127, так і залишком Trp144. Введення флуорофору Trp127 спричинює також різке зростання квантового виходу флуоресценції, обумовлене додатковим внеском залишку Trp127 у загальну емісію білка (рис. 1, спектр 2).

Положення максимуму спектра флуоресценції свідчить про частково експонований характер залишку Trp127 стосовно молекул розчинника, згідно з моделлю структурно-фізичних класів залишків Trp у білках [22]. Аналіз просторової структури

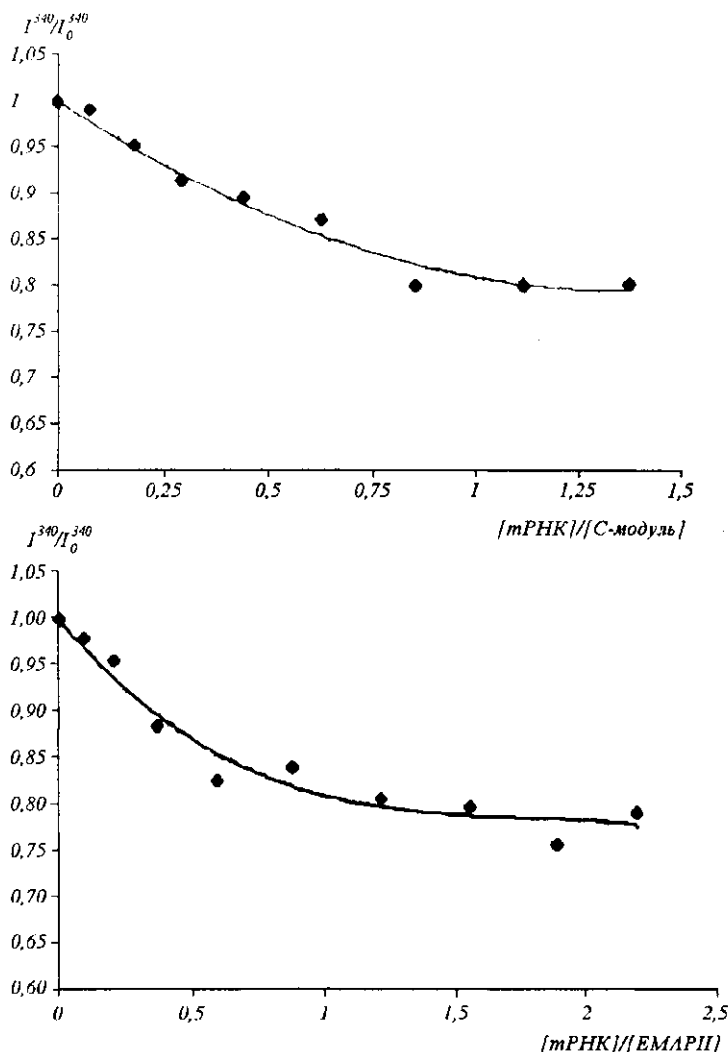


Рис. 3. Флуориметричне титрування розчину С-модуля (а) та ЕМАР ІІ (б) тРНК^{Phe} при 20 °С. Концентрація С-модуля в розчині становила 1 мкМ, концентрація ЕМАР ІІ — 3 мкМ

мутантного С-модуля із заміною Phe127 на Trp (рис. 2) також підтверджує частково експонований характер флуорофору Trp127.

Взаємодія білків з РНК передбачає конформаційні зміни білків і тРНК у процесі формування специфічних комплексів. Раніше нами вивчено конформаційну рухливість ізольованого цитокіну ЕМАР ІІ з використанням власної флуоресценції Trp125 як зонда в структурі цього білка [14, 15], локалізація якого відповідає введеному в мутантний С-модуль Trp127.

Моніторинг конформаційних змін у локальному оточенні флуорофору Trp125 в ЕМАР ІІ дозволив зафіксувати конформаційний перехід за фізіологічної температури (37 °С), який супроводжується частковою експонованістю Trp125 щодо молекул розчинника [15]. Оскільки ароматичний залишок Trp125 ЕМАР ІІ належить до тРНК-

зв'язувального центра і знаходиться в області високої конформаційної рухливості, було висловлено припущення, що цей конформаційний перехід Trp125 є функціонально необхідним для подальшої взаємодії з РНК [15]. Така взаємодія може здійснюватися за різними можливими механізмами, наприклад, внаслідок інтеркаляції ароматичного залишку триптофану між азотистими основами в структурі тРНК чи формуванням стекінгових комплексів без інтеркаляції. Слід відзначити, що всі білки, які містять ОВ-фолд та зв'язують нуклеїнові кислоти, як правило, мають в структурі РНК-зв'язувальних центрів консервативні ароматичні залишки, що є функціонально необхідними при формуванні комплексів білків з РНК [23]. Вірогідно, що С-модуль та ЕМАР ІІ також взаємодіють з тРНК за подібним механізмом, а консервативний ароматичний залишок Phe127 С-модуля, еквіва-

лентний Trp125 в ЕМАР II, може брати участь у комплексоутворенні з тРНК.

Для визначення параметрів зв'язування С-модуля TyrRS з тРНК^{Phe} нами проведено флуориметричне титрування розчину білка тРНК^{Phe}. При збільшенні концентрації тРНК^{Phe} в розчині максимум спектра флуоресценції С-модуля практично не змінювався, натомість спостерігалось суттєве зменшення інтенсивності флуоресценції. Очевидно, це можна пояснити зв'язуванням С-модуля TyrRS з тРНК^{Phe}. Аналогічний ефект гасіння триптофанової флуоресценції при додаванні тРНК без суттєвих змін максимуму спектра емісії нами відмічено і для білка ЕМАР II (рис. 3, б). На основі отриманих експериментальних даних змін власної триптофанової флуоресценції С-модуля TyrRS та ЕМАР II при титруванні тРНК^{Phe} розраховано параметри зв'язування тРНК у цих комплексах (за температури 20 °C), які наведено нижче:

Комплекс С-модуля TyrRS з тРНК^{Phe}: $n = 1,2$
 $K_d \sim 2,9 \cdot 10^{-8}$ М

Комплекс ЕМАР II з тРНК^{Phe}: $n = 1,3$
 $K_d \sim 3,4 \cdot 10^{-7}$ М

Незмінне положення максимуму спектра флуоресценції як С-модуля TyrRS, так і ЕМАР II при титруванні тРНК^{Phe} з високою вірогідністю може свідчити про відсутність інтеркаляції ароматичних залишків триптофану в структуру нуклеїнової кислоти при формуванні комплексів. Отже, функціональна роль ароматичних амінокислотних залишків може реалізуватися за можливим механізмом формування стекінгових взаємодій між індольним кільцем триптофану та азотистими основами РНК.

Роботу виконано за фінансової підтримки гранту № 5.07/200 Державного фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти та науки України.

M. A. Kordysh, A. I. Kornelyuk

Investigation of the interaction between isolated C-module of tyrosyl-tRNA synthetase and tRNA by fluorescence spectroscopy

Summary

The non-catalytic COOH-terminal module of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase manifests a dual function: involvement in tRNA binding as a cis-factor and cytokine activity after proteolytic cleavage from synthetase catalytic core similar to EMAP II cytokine. The C-module of TyrRS contains a single Trp144 which is an intrinsic fluorescent probe in protein structure, but it is

localized outside of RNA binding site. To explore the interaction between C-module and tRNA in solution the conservative aromatic Phe127 residue was substituted for Trp127 fluorophore by site-directed mutagenesis. This replacement allowed enhancing the protein quantum yield and determining the binding parameters of tRNA and C-module. The dissociation constant of the complex between C-module and tRNA^{Phe} was calculated on the basis of spectrofluorometric titrations data. It was about $2.9 \cdot 10^{-8}$, and stoichiometry of the complex $n = 1.2$.

Keywords: tyrosyl-tRNA synthetase, mutagenesis, fluorescence.

M. A. Kordysh, A. I. Kornelyuk

Исследование взаимодействия изолированного С-модуля тирозил-тРНК синтетазы с тРНК методом флуоресцентной спектроскопии

Резюме

Некаталитический С-модуль тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих выполняет двойную функцию: участвует в связывании тРНК как цис-фактор и при протеолитическом расщеплении от каталитического ядра синтетазы проявляет цитокиновую активность подобно цитокину ЕМАР II. С-модуль TyrRS содержит остаток триптофана Trp144, который является флуоресцентным зондом в структуре белка, однако локализован вне сайта связывания РНК. Для исследования взаимодействия изолированного С-модуля с тРНК консервативный ароматический остаток Phe127 в РНК-связывающем центре был заменен на флуорофор Trp127 методами сайт-направленного мутагенеза. Это позволило существенно повысить квантовый выход флуоресценции белка и определить параметры связывания С-модуля с тРНК. На основе данных спектрофлуориметрического титрования определены величина константы диссоциации комплекса С-модуля с тРНК^{Phe}, которая составляет $2,9 \cdot 10^{-8}$ М, и стехиометрия комплекса ($n = 1,2$).

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, мутагенез, флуоресценция.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Mirande M.* Aminocyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes. Structural domains and their implications // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*—1991.—40.—P. 95—142.
2. *Bonnefond L., Giege R., Rudinger-Thirion J.* Evolution of the tRNA^{Tyr}/TyrRS aminoacylation systems // *Biochimie.*—2005.—87.—P. 873—883.
3. *Корнелюк А. И.* Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 4.—С. 349—359.
4. *Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dubrovsky A. L., Murray J. C.* Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Biopolimery i kletka.*—1999.—15, № 2.—P. 168—172.
5. *Wakasugi K., Schimmel P.* Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // *Science.*—1999.—284.—P. 147—151.
6. *Quevillon S., Agou F., Robinson J. C., Mirande M.* The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine // *J. Biol. Chem.* 1997.—272.—P. 32573—32579.
7. *Simos G., Segref A., Fasiolo F., Hellmuth H., Shevchenko A., Mann M., Hurt E. C.* The yeast protein Arc1p binds to tRNA

- and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetase // *The EMBO J.*—1996.—15.—P. 5537—5448.
8. *Kushiro T., Schimmel T.* Trbp111 selectively binds a non-covalently assembled tRNA-like structure // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2002.—99.—P. 16631—16635.
 9. *Shalak V., Kaminska M., Mitnacht-Kraus R., Vandenabeele P., Clauss M., Mirande M.* The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component // *J. Biol. Chem.*—2001.—276.—P. 23769—23776.
 10. *Murzin A.* OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences // *EMBO J.*—1993.—12.—P. 861—867.
 11. *Moras D.* Structural aspects and evolutionary implications of the recognition between tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases // *Biochimie.*—1993.—75.—P. 651—657.
 12. *Кордыш М. А., Одынец К. А., Корнелюк А. И.* Trp144 как флуоресцентный зонд для изучения конформационной подвижности С-модуля эукариотической тирозил-ТРНК синтазы // *Биополимеры и клетка.*—2003.—19, № 5.—С. 436—439.
 13. *Кордыш М. А., Корнелюк А. И.* Мониторинг конформационного изменения окружения флуорофора Trp144 в С-модуле тирозил-ТРНК синтазы при тепловой денатурации // *Доп. НАН України.*—2004.—№ 1.—С. 156—161.
 14. *Кордыш М. А., Корнелюк А. И.* Флуоресценция и динамика структурного окружения флуорофора Trp125 в цитокине ЕМАР II // *Вестн. Харьков. нац. ун-та им. В. Н. Каразина: Биофиз. вестн.*—2003.—Вып. 2 (13)—С. 86—90.
 15. *Кордыш М. О., Дубровський О. Л., Корнелюк О. І.* Локальний конформаційний перехід флуорофора Trp125 в цитокіні ЕМАР II, індукований фізіологічною температурою // *Фізика живого.*—2005.—13, № 1.—С. 79—83.
 16. *Дубровський А. Л., Браун Дж., Корнелюк А. И., Мюррей К., Мацука Г. Х.* Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина ЕМАР II и цитокиноподобного домена тирозил-ТРНК синтазы млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*—2000.—16, № 3.—С. 229—235.
 17. *Каниболоцкий Д. С., Одынец К. А., Скурский С. И., Корнелюк А. И.* Изучение внутримолекулярной подвижности цитокин-подобного С-концевого модуля тирозил-ТРНК синтазы млекопитающих методом молекулярной динамики // *Фізика живого.*—2003.—11, № 2.—С. 61—71.
 18. *Roy S.* Fluorescence quenching methods to study protein-nucleic acid interaction // *Meth. Enzymol.*—2004.—379.—P. 175—187.
 19. *Golub A., Petrushenko Z., Odynets K., Dubrovsky A., Rozhko O., Matsuka G., Solecka K., Olszak K., Przykorska A., Kornelyuk A.* Cytokine-like C-terminal module of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase reveals structure-specific tRNA binding: Computational docking modeling and footprint analysis // *Aminoacyl-tRNA synthetases in biology, medicine, and evolution.*—Asilomar, 2002.—P. 116.
 20. *Renault L., Kerjan P., Pasqualato S., Menetrey J., Robinson J. C., Kawaguchi S., Vassylyev D. G., Yokoyama S., Mirande M., Cherfils J.* Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry // *EMBO J.*—2001.—20.—P. 570—578.
 21. *Lakowicz J. R.* Principles of fluorescent spectroscopy / 2nd Edition.—New York: Plenum Press, 1999.—725 p.
 22. *Reshetnyak Y. K., Koshevnik Y., Burshtein E. A.* Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and micro-environment parameters of individual tryptophan residues // *Biophys. J.*—2001.—81.—P. 1735—1758.
 23. *Draper D. E.* Themes in RNA-protein recognition // *J. Mol. Biol.*—1999.—293.—P. 255—270.

УДК 577.322

Надійшла до редакції 12.05.06