

Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих

А. И. Корнелюк

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

В обзоре представлены основные результаты структурно-функционального исследования тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих (КФ 6.1.1.1). Рассмотрена множественность молекулярных форм фермента. Изучена структура активного центра синтетазы методами химических модификаций и показана существенная роль остатков лизина, гистидина и цистеина. Показано, что во взаимодействии с основной формой тирозил-тРНК синтетазы вовлекается антикодон гомологичной тРНК^{Tyr}. Обнаружены специфические конформационные изменения фермента при взаимодействии с субстратами, в том числе с тРНК^{Tyr}; выявлена конформационная адаптация центров связывания тРНК и АТФ. На основании полученных данных предложена динамическая модель функционирования синтетазы. Определена первичная структура тирозил-тРНК синтетазы быка с помощью клонирования и секвенирования кДНК. Предложена модульная организация фермента: каталитическая часть, состоящая из свертки Россмана и α -спирального домена, соединена с цитокиноподобным некаталитическим модулем, обладающим средством к РНК. Предложена гипотеза образования изолированного С-домена вследствие ограниченного протеолиза после активации внутриклеточных протеаз и проявления этим доменом цитокиноподобной активности, аналогично цитокину ЕМАР II.

Введение. Одним из ключевых этапов процесса реализации генетической информации является ферментативное аминокислотирование тРНК аминокислот-тРНК синтетазами (АРСаза, КФ 6.1.1) на дорибосомном этапе биосинтеза белка [1, 2]. При узнавании аминокислот-тРНК синтетазами гомологичных тРНК реализуется один из наиболее высокоспецифических процессов белково-нуклеинового узнавания. Для выяснения молекулярных механизмов специфического аминокислотирования тРНК необходимо детальное изучение структурно-функциональной организации АРСаз.

АРСаза высших эукариот отличается более сложной структурой по сравнению с прокариотическими АРСазами [1—4]. Это обусловлено усложнением генома и возникновением дифференциации у многоклеточных организмов, что требует большего совершенствования аппарата биосинтеза белка и его регуляции.

Характерной особенностью АРСаз высших

эукариот является тенденция к формированию ими стабильных высокомолекулярных ассоциатов — кодосом, в состав которых входят девять АРСаз и три дополнительных белка [1—4]. АРСазы высших эукариот отличаются также множественностью молекулярных форм фермента, структурные основы которой изучены еще недостаточно.

Существенно, что АРСазы эукариот могут выполнять и неканонические функции, например, участвовать в сплайсинге РНК [5], ассоциации с мРНК [6], в регуляции биосинтеза аминокислот [7], синтезе Ар₄А [8], в патогенезах при аутоиммунных заболеваниях [9, 10] и в других процессах.

Тирозил-тРНК синтетаза быка является одной из наиболее полно изученных АРСаз млекопитающих. В последнее время определена полная аминокислотная последовательность этого фермента. В данном обзоре суммированы результаты структурно-функционального исследования тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, проведенных в отделе структуры и функций нуклеиновых кислот Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины в 1988—1997 годах.

Множественность молекулярных форм тирозил-тРНК синтетазы. При выделении и исследовании тирозил-тРНК синтетазы из печени быка нами обнаружена множественность молекулярных форм этого фермента [11—15], которая может быть связана с особенностями его функционирования в белоксинтезирующем аппарате эукариотической клетки.

Согласно полученным данным, основная форма тирозил-тРНК синтетазы из печени быка является структурным димером α_2 -типа и имеет молекулярную массу 2×59 кДа [11]. Наряду с основной формой синтетазы нами также была выделена и изучена функционально активная протеолитически модифицированная форма тирозил-тРНК синтетазы с молекулярной массой 2×39 кДа [12, 15]. Каталитические свойства этой формы тирозил-тРНК синтетазы оказались близкими к таковым основной формы фермента как в реакции аминоацилирования тРНК, так и в реакции АТФ- $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена (табл. 1).

Обнаружено, что N-концевые аминокислоты как в основной форме тирозил-тРНК синтетазы, так и в протеолитически модифицированной форме фермента блокированы ковалентными модификациями и не подвергаются Эдман-деградации [15]. Это позволило предположить, что протеолитическое расщепление полипептидной цепи происходит в С-концевой части, и в структуре тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих имеется дополнительный С-концевой фрагмент полипептидной цепи

размером около 20 кДа, несущественный для каталитической функции фермента.

Подобные N- или С-концевые удлинения полипептидной цепи являются характерной особенностью многих эукариотических АРСаз [3, 4]. Таким образом, эукариотическая тирозил-тРНК синтетаза имеет в своей структуре каталитический модуль с присоединенным к нему С-концевым полипептидным фрагментом, необходимым, вероятно, для выполнения дополнительных функций.

При выделении тирозил-тРНК синтетазы из печени быка нами обнаружена и очищена до гомогенного состояния Р1-форма фермента, активная только в реакции АТФ- $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена [11, 15]. Р1-форма возникает, по-видимому, в результате ковалентной модификации основной формы синтетазы (предположительно, фосфорилирования), приводящей к потере активности фермента в реакции аминоацилирования тРНК.

При хроматографии Р1-формы тирозил-тРНК синтетазы на оксиапатите наблюдается ее разделение на два компонента, А и В. Показано, что в димерной Р1-форме синтетазы модифицируется только А-субъединица фермента, тогда как В-компонент сохраняет тРНК-связывающую способность [11].

Сродство тирозил-тРНК синтетазы к высокомолекулярным РНК. Проблема компартиментализации аппарата биосинтеза белка разработана в работах Спирина и соавт. [16—18]. В этих публикациях постулируется предположение о том, что

Таблица 1

Каталитические характеристики основной и протеолитически модифицированной форм тирозил-тРНК синтетазы печени быка

Тирозил-тРНК синтетаза, кДа	K _m			K _{кат.} мин ⁻¹	K _{кат./K_m} мин ⁻¹ М ⁻¹ · 10 ⁻⁶
	Г-Тур, мкМ	АТФ, мМ	тРНК ^{Тур} , мкМ		
<i>АТФ-$[^{32}\text{P}]$пирофосфатный обмен</i>					
2 × 59	28,5	0,29	—	290	1,0
2 × 39	29	0,60	—	300	0,5
<i>Аминоацилирование тРНК</i>					
2 × 59	1,0	0,125	0,75	2,97	4,304
2 × 39	1,5	0,160	1,19	2,99	2,512

Примечание. Расчеты проводили по программе "Enzfitter".

основой для компартиментализации белков эукариотического аппарата трансляции вблизи мест их функционирования (т. е. на полирибосомах) служит эволюционно приобретенная способность этих белков взаимодействовать с высокомолекулярными РНК.

Нами обнаружено [11, 13], что высокоочищенной тирозил-тРНК синтетазе из печени быка присуще сродство к высокомолекулярным РНК, аналогично многим другим АРСазам млекопитающих. Интересно отметить, что протеолитически модифицированная функционально активная форма (2×39 кДа) тирозил-тРНК синтетазы также частично сохраняет рРНК-связывающую способность [12], однако ее активность, в отличие от основной формы, не ингибируется рибосомной РНК [13]. Сродством к рРНК обладает также и тирозил-тРНК синтетеза из низших эукариот — дрожжей [13]. В то же время бактериальная тирозил-тРНК синтетеза не связывалась с рРНК-сефарозой, а ее аминокотилирующая активность не ингибировалась рРНК.

Какой же механизм обеспечивает сродство эукариотических аминокотил-тРНК синтетаз к высокомолекулярной РНК? Предполагается, что взаимодействие эукариотических АРСаз с высокомолекулярным РНК может осуществляться за счет связывания кластеров положительно заряженных аминокислотных остатков на поверхности фермента с сахарофосфатным остовом РНК.

Высокомолекулярный лабильный комплекс тирозил-тРНК синтетазы. Тирозил-тРНК синтетеза млекопитающих не входит в состав стабильных комплексов АРСаз (кодосом), поэтому иногда ее рассматривают как «свободный» фермент. В то же время аппарат биосинтеза белка эукариот — это высокоорганизованный динамичный трехмерный каркас, включающий также лабильные ассоциаты его отдельных компонентов. Нами впервые была изучена возможность подобной ассоциации тирозил-тРНК синтетазы в лабильные комплексы [14]. При выделении тирозил-тРНК синтетазы из печени быка без замораживания ткани фермент обнаруживается в безрибосомном экстракте в виде высокомолекулярного комплекса, из которого затем диссоциирует через промежуточный лабильный комплекс (около 220 кДа) до свободной формы [11, 14]. В составе этого комплекса тирозил-тРНК синтетеза обладает повышенной устойчивостью к термоинактивации. К сожалению, из-за высокой лабильности такого высокомолекулярного комплекса не удалось очистить его до гомогенного состояния и изучить природу компонентов, взаимодействующих с тирозил-тРНК синтетазой. Возможно, ими явля-

ются другие белки аппарата трансляции, например, субъединицы фактора элонгации. Ассоциация с партнерами по комплексу осуществляется без участия рРНК-связывающего сайта тирозил-тРНК синтетазы, поскольку промежуточный комплекс с молекулярной массой 220 кДа не отличается от свободного фермента по сродству к рРНК-сефарозе. Изучение ассоциации тирозил-тРНК синтетазы с другими макромолекулами представляют существенный интерес с точки зрения выяснения взаимосвязи реакции, катализируемой этим ферментом, с другими биохимическими процессами в эукариотической клетке.

Иммунохимическое исследование тирозил-тРНК синтетазы. Для осуществления структурно-функционального анализа эукариотической тирозил-тРНК синтетазы нами использованы также иммунохимические методы исследования [19—21]. Были получены моноклональные и поликлональные моноспецифические антитела к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка и изучены разные молекулярные формы синтетазы. Линия гибридом T_3 , секретирующая моноклональные антитела к бычьей тирозил-тРНК синтетазе, получена с использованием нового метода селекции гибридом, основанного на определении ферментативной активности белка-антигена [19].

Обнаружено, что антигенная детерминанта для моноклональных антител T_3 локализована вне активного центра фермента. Она сохраняется и у протеолитически модифицированной формы фермента, в которой отщеплен С-концевой фрагмент полипептидной цепи, несущественный для каталитической активности синтетазы [19].

С использованием моноклональных антител изучена эволюционная консервативность данной антигенной детерминанты. Установлено, что она является общей для тирозил-тРНК синтетаз млекопитающих (печень кроля, печень быка, плацента человека), но отсутствует у низших эукариот (дрожжи) и у бактерий, т. е. является эволюционно приобретенной только тирозил-тРНК синтетазами высших организмов [20].

Структура активного центра тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих. Методами селективных химических модификаций нами изучена структура активного центра эукариотической тирозил-тРНК синтетазы. На основании полученных данных сделан вывод о том, что существенными для тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих являются остатки гистидина [22], цистеина [15], лизина [24—26]. Два модифицируемых диэтилпинокarbonатом остатка гистидина в бычьей тирозил-тРНК синтетазе, по-видимому, вовлекаются во

взаимодействие с тирозиладенилатом на этапе активации аминокислоты [22]. Они могут соответствовать остаткам гистидина в тирозил-тРНК синтетазе из *Bacillus stearothermophilus*, вовлеченным в стабилизацию переходного состояния [23]. Модифицируемая сульфидрильная группа функционально важного остатка цистеина в тирозил-тРНК синтетазе, скорее всего, вовлечена в формирование структуры активного центра, но не в связывание субстратов.

Одним из наиболее интересных структурных элементов тРНК-связывающего центра бычьей тирозил-тРНК синтетазы является функционально важный остаток лизина, при модификации которого проявляется антикооперативность взаимодействия двух субъединиц синтетазы [25, 26]. Этот остаток, возможно, соответствует остатку лизина в тирозил-тРНК синтетазе из *B. stearothermophilus*, участвующему в формировании дополнительного контакта с тРНК^{Tyr} (аденином-73) в переходном состоянии, и является критическим для узнавания тРНК^{Tyr} среди других тРНК *B. stearothermophilus* [27].

Нами также были выполнены эксперименты по химической модификации остатков триптофана тирозил-тРНК синтетазы из печени быка реагентом 2-окси-5-нитробензилбромидом и показано отсутствие влияния модификации на ферментативную активность синтетазы в реакции аминокислотирования гомологичной тРНК^{Tyr} [15]. Эти данные позволили сделать вывод о том, что остатки триптофана не являются функционально важными для эукариотической тирозил-тРНК синтетазы.

Узнавание тирозил-тРНК синтетазой гомологичной тРНК^{Tyr} быка. Одна из главных задач структурно-функционального изучения эукариотической тирозил-тРНК синтетазы состоит в установлении молекулярных механизмов узнавания гомологичной тРНК^{Tyr}. Согласно современным представлениям, узнавание тРНК АРСазами является двухэтапным процессом: на первом этапе происходит статическое равновесное связывание тРНК (сканирование), а на втором — конформационная подстройка обоих партнеров комплекса (адаптация), завершающаяся образованием продукта реакции — аминокислот-тРНК [1, 2].

Проблема узнавания эукариотической тРНК^{Tyr} тирозил-тРНК синтетазой чрезвычайно важна еще и потому, что эукариотическая тРНК^{Tyr} содержит короткую дополнительную петлю (тип I), в отличие от прокариотических тРНК^{Tyr}, являющихся длиннопетлевыми (тип II), т. е. наблюдается эволюционное переключение между типами тРНК при переходе от прокариот к эукариотам. Перекрестное

аминоацилирование бактериальной тРНК^{Tyr} эукариотическим ферментом отсутствует [13, 15]. Таким образом, можно предположить различные механизмы узнавания тРНК^{Tyr} гомологичными синтетазами в бактериальной и эукариотической системах.

Области контакта между тРНК и синтетазой в эукариотической системе тРНК^{Tyr}—тирозил-тРНК синтетазы изучены нами с использованием метода химических модификаций тРНК нитрозоэтилмочевинной [28]. Доступность фосфатов тРНК^{Tyr} была для модификации нитрозоэтилмочевинной исследовали вначале для свободной тРНК в условиях поддержания ее нативной третичной структуры, а также в комплексе с тирозил-тРНК синтетазой. Ряд фосфатных остатков тРНК^{Tyr} имел пониженный уровень модификации в присутствии гомологичной тирозил-тРНК синтетазы, что позволило отнести эти участки к областям контакта белок—нуклеиновая кислота.

Обнаружено, что протеолитически модифицированная 39К-форма тирозил-тРНК синтетазы эффективно защищает от алкилирования остатки фосфатов в D-петле (положение 21), антикодоновой ветви (положение 31), на стыке антикодоновой и вариабельной ветвей (положение 44) и фосфаты 59—64 в ТЧС-ветви. Область антикодона тРНК^{Tyr} печени быка не защищена от модификации в комплексе с «укороченной» формой синтетазы, лишенной C-концевого домена.

В то же время при изучении взаимодействия бычьей тРНК^{Tyr} с основной 59К-формой тирозил-тРНК синтетазы получены предварительные данные о том, что область антикодона (фосфаты 34, 35 и 36) защищена от модификации нитрозоэтилмочевинной [28]. Следовательно, две формы тирозил-тРНК синтетазы, по-видимому, могут иметь отличающиеся механизмы взаимодействия с гомологичной тРНК^{Tyr}. Полученные результаты согласуются с концепцией Шиммеля об эволюции структуры АРСаз: слияния каталитического нуклеотидсвязывающего модуля и домена, ответственного за связывание антикодона тРНК [2, 29].

Анализ структурных элементов тРНК, участвующих во взаимодействии с синтетазой, требует более полного исследования, а также изучения влияния низкомолекулярных субстратов, АТФ и аминокислоты на характер взаимодействия между белком и тРНК.

Конформационные изменения тирозил-тРНК синтетазы при взаимодействии с субстратами. Важную роль в механизме функционирования АРСаз играют взаимные конформационные изменения синтетазы и тРНК в процессе их узнавания [1, 2].

При исследовании взаимодействия эукариотической тирозил-тРНК синтетазы с субстратами нами обнаружены специфические конформационные изменения фермента [15, 30, 31]. В этих экспериментах использовали метод переноса энергии возбуждения флюоресценции между остатками триптофана синтетазы и ковалентно присоединенным флюоресцентным зондом AEDANS. Последний локализован вне активного центра тирозил-тРНК синтетазы (форма 2×59 кДа), по-видимому, в С-домеи синтетазы, отщепляемом при ограниченном протеолизе. Данная модификация не влияла на активность фермента в реакции аминокислотирования тРНК.

Образование тирозиладенилата сопровождалось конформационным изменением синтетазы [31], приводящим к возрастанию эффективности переноса энергии возбуждения и уменьшения расстояния донор — акцептор (табл. 2).

Взаимодействие тирозил-тРНК синтетазы с гомологичной тРНК^{Tyr} из печени быка также сопровождалось конформационным изменением фермента и увеличением интенсивности флюоресценции связанного зонда [30]. Важно отметить, что такое конформационное изменение не индуцировала тРНК^{Tyr} *Escherichia coli*, которая не аминокислотируется эукариотической тирозил-тРНК синтетазой (табл. 2).

При добавлении АТФ к комплексу тирозил-тРНК синтетазы с гомологичной тРНК^{Tyr} наблюдалось последующее изменение конформации, сопровождающееся уменьшением расстояния донор — акцептор в ферменте [30]. Полученные данные указывают на существование конформационного взаимодействия между центрами связывания тРНК

и АТФ в тирозил-тРНК синтетазе из печени быка. Таким образом, узнавание гомологичной тРНК^{Tyr} сопровождается конформационным изменением фермента, которое затем индуцирует формирование оптимальной конформации для последующего связывания АТФ.

Обнаруженный нами эффект взаимодействия центров связывания АТФ и гомологичной тРНК в аминокислот-тРНК синтетазе I структурного класса позволяет высказать предположение о его возможной роли в повышении специфичности при отборе тРНК. Подобный вывод был получен Стайтц и соавт. [32] при изучении комплексов глутаминил-тРНК синтетазы (класс I) с тРНК^{Gln} и АТФ методом рентгеноструктурного анализа. Авторы [32] предположили, что взаимодействие антикодона гомологичной тРНК^{Gln} с подвижными фрагментами белка «запускает» конформационное изменение, необходимое для последующего связывания АТФ [32].

Динамическая модель функционирования эукариотической тирозил-тРНК синтетазы. Функциональные свойства ферментов, согласно современным представлениям, могут быть адекватно описаны с точки зрения их динамики в растворе [33—35]. Следовательно, для выяснения молекулярного механизма функционирования АРСаз необходимо изучение их динамических свойств в растворе в нативных условиях.

Детальное исследование внутримолекулярной динамики эукариотической тирозил-тРНК синтетазы проведено нами в работах [15, 36—39]. С использованием таких подходов, как изучение температурного тушения триптофановой флюоресценции белка и тушение флюоресценции низкомоле-

Таблица 2

Флюоресцентные свойства AEDANS-меченной тирозил-тРНК синтетазы и ее комплексов с субстратами

Фермент	λ_{max} , нм (± 1)	E , % (± 2)	R_0 , Å (± 1)	R_0 , Å (± 1)
AEDANS-TyrPC	477	81	35,0	27,4
AEDANS-TyrPC + тРНК ^{Tyr} печени быка	477	87	35,0	25,3
AEDANS-TyrPC + тРНК ^{Tyr} печени быка + АТФ	477	90	35,0	24,1
AEDANS-TyrPC + тРНК ^{Tyr} <i>E. coli</i>	477	82	35,0	27,0
AEDANS-TyrPC + Tyr + АТФ	476	93	35,0	22,3
AEDANS-TyrPC + АТФ + Tyr	476	90	35,0	24,1
AEDANS-TyrPC + АТФ + Phe	476	81	35,0	27,4
Свободный AEDANS	493	—	—	—

кулярными тушителями, показано наличие в растворе конформационной подвижности тирозил-тРНК синтетазы, для которой характерны низкие энергии активации (около 15—20 ккал/моль) и регуляция диффузионными характеристиками растворителя. С использованием спектроскопии краевого возбуждения флуоресценции продемонстрировано, что быстрая диполь-релаксационная динамика изменяется при специфическом процессе узнавания тРНК^{Tyr}.

Амплитуда конформационных флуктуаций тирозил-тРНК синтетазы оценена при изучении температурной зависимости переноса энергии возбуждения между остатками триптофана и флуоресцентным зондом пиридоксаль-5'-фосфатом, введенным в структуру тРНК-связывающего центра [38], и находится в пределах от 0,5 до 2,8 Å. Следует подчеркнуть, что акцептор (пиридоксаль-5'-фосфат-меченный остаток лизина) локализован в активном центре фермента и вовлечен в процесс взаимодействия с тРНК. Таким образом, полученные данные могут характеризовать конформационную подвижность участков структуры фермента, непосредственно вовлеченных в формирование активного центра.

На основании полученных нами данных можно сформулировать динамическую модель функционирования тирозил-тРНК синтетазы в процессе аминоацилирования гомологичной тРНК [15, 39]. Согласно этой модели, синтетаза характеризуется наличием быстрой внутримолекулярной подвижности белка, опосредованной диффузионными характеристиками растворителя. Существенно, что значительной конформационной подвижностью обладают также некоторые участки структуры активного центра. Конформационная подвижность фермента, по-видимому, определяет более крупномасштабные конформационные изменения, обеспечивающие специфическое связывание субстратов, включая узнавание гомологичной тРНК. Первичная и пространственная структуры участков связывания тРНК в синтетазе эволюционно адаптированы для осуществления продуктивного конформационного изменения.

Кроме того, благодаря конформационной подвижности реализуются также взаимодействия между пространственно разобщенными субстрат-связывающими центрами тРНК и АТР. Взаимная структурная адаптация этих центров может вносить существенный вклад в повышение специфичности реакции аминоацилирования тРНК аминоксил-тРНК синтетазами.

Аминокислотная последовательность тирозил-тРНК синтетазы быка. Для дальнейшего стру-

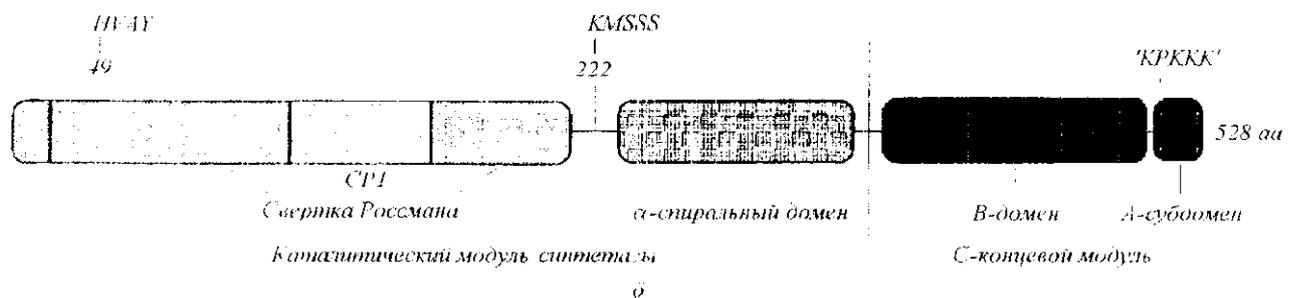
ктурно-функционального анализа эукариотической тирозил-тРНК синтетазы необходимо знание ее первичной структуры. Для этого нами проведено клонирование и секвенирование кДНК, кодирующей данный фермент. На первом этапе этой работы осуществлены ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование кДНК-фрагмента, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен (свертку Россмана) [40]. Затем с помощью скрининга кДНК-библиотеки из печени быка выделена и секвенирована кДНК, кодирующая неполную аминокислотную последовательность полипептидной цепи тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих [41]. Для определения 3'- и 5'-последовательностей полной кДНК использованы методы 3'-RACE и метод инвертированного ПЦР соответственно [42]. Полная аминокислотная последовательность тирозил-тРНК синтетазы, выведенная на основании нуклеотидной последовательности кДНК, представлена на рис. 1, а.

Аминокислотная последовательность бычьей тирозил-тРНК синтетазы содержит оба сигнатурных мотива, характерных для APCаз I структурного класса, HVAY и KMSSS. Впервые обнаружен аномальный вариант HIGH-подобного мотива, в котором консервативный остаток Gly заменен на Ala [40]. В структуре синтетазы можно выделить каталитическую часть, гомологичную другим эукариотическим тирозил-тРНК синтетазам из *Pneumocystis carinii* (62 % идентичности), *Saccaromyces cerevisiae* (59 %), и С-концевой некаталитический модуль, характерный только для фермента млекопитающих (рис. 1, б).

Уровень гомологии с бактериальными тирозил-тРНК синтетазами является низким и составляет около 16 % идентичности. В то же время обнаружено, что из 17 аминокислотных остатков, существенных для образования тирозиладенилата в бактериальной тирозил-тРНК синтетазе, 11 являются консервативными в синтетазе млекопитающих. Это позволяет предположить некоторое сходство механизмов активации аминокислоты бактериальным и эукариотическим ферментами. Однако очевидны и отличия: остаток Cys-35 бактериальной тирозил-тРНК синтетазы, участвующий в образовании водородной связи с 3'-ОН-группой рибозы в Tug-AMP [23], не является консервативным в тирозил-тРНК синтетазе быка. Еще большие отличия обнаружены при сравнении остатков, критичных для узнавания гомологичных тРНК: консервативным является только один остаток, что хорошо согласуется с предположением о разных механизмах узнавания тирозиновой тРНК бактериальным и эукариотическим ферментами.

MGDSLSPEEK	LSLITRNLQE	VLGEEKLKEI	LKERELKVYW	GTATTGKPHV	AYFVPMSKIA	60
DFLKAGCEVT	ILFADLHAYL	DNMKAPWDVL	ELRTSYENV	IKAMLESIGV	PLEKLRFIKG	120
TDYQLSKEYT	LDVYRLSSVV	TQHDAKKAGA	EVVKQVEHPL	LSGLLYPGLQ	ALDEEYLKVD	180
AQFGGVDQRK	IFTFAEKYLP	ALGYSKRIHL	MNPMVPLTG	SKMSSSEES	KIDLLDRKED	240
VKKKLKKAFC	EPGNVENNGV	LAFIRHVLFP	LKSEFVILRD	EKWGGNKTYT	AYLDLEKDEA	300
DEVVHPGDLK	NSVEVALNKL	LDPIREKFNT	PALKKLSSAA	YPDPSKQKPA	VKGPAPKNSP	360
EEVIPSRLDI	RVGKVISVDK	HPDADSLYVE	KIDVGEAEPR	TVVSGLVQFV	PKEELQDRLV	420
VVLCNLKPQK	MRGVKSQGML	LCASVEGVNR	KVEPLDPPAG	SAPGERVFVK	GYEKGQPDEE	480
LKPKKKVFEK	LQADFKISDE	YIAQWKQTNF	MTKMGSVSCK	SLKGGNIS		528

a



b

Рис. 1. Аминокислотная последовательность тирозил-ТРНК синтетазы быка, выведенная по расшифрованной нуклеотидной последовательности кДНК (a); выделены сигнатурные аминокислотные мотивы, HVAY и KMSSS, характерные для APCаз I структурного класса), и схема модульной организации полипептидной цепи синтетазы (b)

Сравнение аминокислотной последовательности С-домена бычьей тирозил-ТРНК синтетазы с некоторыми гомологичными последовательностями представлено на рис. 2. Обнаружена гомология с новым цитокином, белком ЕМАР II (63 %) [43—45]. Этот фрагмент также имеет гомологию с С-концевым участком метионил-ТРНК синтетазы *Caenorhabditis elegans* (62 %) [46] и с С-концевой частью белка Arg1p из *S. cerevisiae* (55 %), функция которого, согласно [47], состоит в связывании тРНК и их транспорте к активным центрам ассоциированных с ним APCаз.

Предполагаемый цитокин ЕМАР II представляет собой полипептид, активирующий эндотелиальные клетки и моноциты при химическом канцерогенезе [43—45]. Недавно обнаружено, что полипептидом — предшественником этого цитокина является белок р43, — несинтезируемый компонент кодосомного комплекса APCаз [48].

В С-концевом некаталитическом фрагменте бычьей тирозил-ТРНК синтетазы можно выделить В-домен (область 366—470) и А-субдомен (471—528) [42]. Гомологичные В-домени последовательности обнаружены у прокариотических белков (метионил- и фенилаланил-ТРНК синтетазы *E. coli* и *Thermus thermophilus*, белок YGJH *E. coli* и др.), тогда как А-субдомен имеется только в белках эукариот (ЕМАР II млекопитающих, метионил-ТРНК синтетазы нематоды, белок Arg1p дрожжей).

Функциональная роль В-домена в бактериальных APCазах не установлена. Известно, например, что С-домен метионил-ТРНК синтетазы *E. coli* также отщепляется при ограниченном протеолизе и является несущественным для каталитической активности этого бактериального фермента [49] — аналогично тирозил-ТРНК синтетазе млекопитающих. Предполагалась его роль в димеризации бактериальной метионил-ТРНК синтетазы [49].

Междоменное соединение			Некаталитический С-концевой модуль	
			В-домен	
TyrRS	<i>B. taurus</i>	353	GGAKNSEPREEVIP	SRRLDIRVGVKVISVDKHPDADSLYVEKIDVGEAEPRVVSGLVQVFRKELQORLVVVVCSLAKPQKMGVKSQGMILLCAS
proEMAPII	<i>H. sapiens</i>	140	SIAGSADSKPIDV	SRRLDLRIGCII TARKHPDADSLYVEVDVGEIAPRTVVSGLVNHVFLQMQNENMVILLCSLAKPQKMGVKSQGMILLCAS
MetRS	<i>C. elegans</i>	745	GAAAPVDDTIDV	GRLLDMRVGRIIKCEKHPDADSLYVEQIDVGEIAPRTVVSGLVNRHFLQMQNENMVILLCSLAKPQKMGVKSQGMILLCAS
Arc1p	<i>S. cerevisiae</i>	134	QEQQKAKPKPKP	SAIDPRVGFIQKAIKHPDADSLYVSTIDVGEIAPRTVVSGLVNRHFLDAMQERVVVCSLAKPQKMGVKSQGMILLCAS
MetRS	<i>E. coli</i>	553	DDPIQETITFEDF	AKVDLKVALIENAEVYVGSDDLLRLTLDLQGEKRNVESSIRSAV2PCALIGRHTIMVNLAEPRKMGVKSQGMILLCAS
MetRS	<i>M. jannaschii</i>	539	GGEMEQIDISYL	EKIDLRVGLVVEAEDIKSKKLLKLNVDLQDEKRNQIVSSTIKGYYPEDLVGKRVVVICSLAKPQKMGVKSQGMILLCAS
YGJH	<i>E. coli</i>	1	METVAYADF	ARLEMDVGVKIVKRNENADKIKLVQVDVQKTLQTVTSINVPYYSSEELMGKTVVVVCSLAKPQKMGVKSQGMILLCAS
PheRSβ	<i>E. coli</i>	20	AGLEVDGVLPVAG	SFHGVVVGVEVCAQHPNADKLRVTKVNVVGGDRLLDIVCQAPNSRVAVTIIGAVLPGDFKIKAAKLRGEPSEGMILLCAS
PheRSβ	<i>T. thermophil.</i>	78	LGPETDRIRVVF	TPRGVVFARVLEAHPFGTRLKRLVLDAGRTVEVVVSGAENSGVALALPGTELPQZQKVGKRVIQGVRSGMALSER

			А-субдомен	
TyrRS	<i>B. taurus</i>	445	VEGVNKKVEPLDPPAGSAPGERVT	VKGVYKQGFDEKLPKPKVFFELQADFKISDENTYLAQKQTHFMTQMGVSCRSLEKQGHIS* 528aa
proEMAPII	<i>H. sapiens</i>	232	SPE...KIEILAPFNGSVFGERLT	FDAEPGEFVDKELNPKKIKWELQFDLHNTDECVATYKGVVPEVKGKGVCRAGTMSNSGIK* 312aa
MetRS	<i>C. elegans</i>	837	SPD...KVEIMEVFPADSKPQTPVW	CPPTMHRFDKQINPKKIKWELVAEDLKVBAEGEADKQGPLLIGSESKMTATTLRQVHVK* 917aa
Arc1p	<i>S. cerevisiae</i>	237	NDD...KVFVVEFPKDSKAPQDKVT	FEQFQDEAPMKQINPKKIKWELQPHFTTNDGLEVIKQDEIINAKGESPKVA.SIANAQV** 376aa
MetRS	<i>E. coli</i>	655	PGGK...DYFLLSFDAGAKPKQKVK*	676aa
MetRS	<i>M. jannaschii</i>	630	DDEG...NVSLITVQKDIKAGSKVR*	651aa
YGJH	<i>E. coli</i>	38	TDDG.SESVLLTPERMMPAGVQVW*	110aa
PheRSβ	<i>E. coli</i>	124	ELQI2DHSGLIELEADVRIQTDIR	EYKLDENTIEISVTPNRRADCLG 171/795aa
PheRSβ	<i>T. thermophil.</i>	122	ELGVZYGGGLLEFFEDAL2GTPLS	EA.WPEVVDLLEVTNRRPDALG 169/705aa

Рис. 2. Гомологии аминокислотной последовательности С-концевого домена тирозил-тРНК синтетазы быка и других белков. Обозначения: TyrRS, тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus*; proEMAP II, предшественник цитокина EMAP II (U10117); MetRS, метионил-тРНК синтетаза *C. elegans* (g1370034), *E. coli* (P00959) и *M. jannaschii* (Q58659); Arc1p, тРНК-связывающий кофактор *S. cerevisiae* (P46672); YGJH, гипотетический белок *E. coli* (P42589); PheRSβ, β-субъединицы фенилаланил-тРНК синтетаз *E. coli* (P07395) и *T. thermophilus* (P27002)

IL-1β Human	PFIFEEERIFFDTWDNEAYVHDA^PVR	SLNCTLRDSQQKSLV	IMSGPY
IL-8 Human	MTSKLAVALLAFLISAALCEGAVLR	RSAKELRCQCIKTYS	KPFHP
IL-8 Sheep	MTSKLAVALLAFLLSAALCEAAVLS	RMSTELRCQCIKTHS	TPFHP
VWF Human	PGLHNSLVKLLKHGAGVAMDGQDIQLP	LLKGDLRICHTVTAS	IVRLSY
proEMAP II Human	IEKKGKKEKQKQSIAGSAD^SKPIDV	VSRLLDLRIGCIITAR	KHPDA
TyrRS Bovine	AYPDPSKQKPAVKGPAKNS^PREEVI	PSRLDIRVGVKVISVD	KHPDA

Рис. 3. Гомология N-концевого участка С-домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с некоторыми цитокинами: интерлейкином 1β, интерлейкином 8, фактором Виллебранда и proEMAP. Обозначения: ^ — место расщепления предшественников цитокинов; * — предполагаемый сайт протеолитического расщепления тирозил-тРНК синтетазы быка

Из полученных нами ранее данных [13] следует, что некаталитический С-домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих вносит существенный вклад (не менее 50 %) в сродство бычьей синтетазы к высокомолекулярным РНК. Однако неизвестно, связано ли это свойство с В-доменом, гомоло-

гичным бактериальным белкам, или, возможно, обусловлено наличием А-субдомена, содержащего Lys-богатый кластер аминокислот KPKKK. Известно, что кластеры заряженных остатков Lys могут вовлекаться в белково-нуклеиновые взаимодействия в других РНК-связывающих белках [51].

В последнее время была опубликована аминокислотная последовательность тирозил-тРНК синтетазы человека [52] и независимо подтверждена гомология С-домена с ЕМАР II цитокином.

Следует также отметить определенную гомологию аминокислотных последовательностей N-концевой части С-домена тирозил-тРНК синтетазы и зрелого цитокина ЕМАР II с некоторыми другими цитокинами: интерлейкином 1 β , интерлейкинами 8 и фактором Виллебранда (рис. 3).

С-домен тирозил-тРНК синтетазы соединен с каталитическим ядром фермента пептидным участком 340—365 [42]. В этом участке возможным сайтом протеолитического расщепления является аминокислотная последовательность S₃₅₈EPE. Последняя представляет собой PEST-подобную аминокислотную последовательность, которые, как известно [53], могут быть первичными сайтами для протеолитической атаки внутриклеточными протеазами ряда белков, включая аминоацил-тРНК синтетазы млекопитающих [53]. Этот предполагаемый сайт расщепления в тирозил-тРНК синтетазе соответствует месту расщепления при образовании зрелого цитокина ЕМАР II из его предшественника проЕМАР II.

На основании полученных данных можно предложить гипотезу о том, что изолированный С-домен вследствие возможного протеолитического расщепления тирозил-тРНК синтетазы внутриклеточной протеазой, активируемой, например, при апоптозе, может проявлять цитокинподобную активность. Экспериментальное доказательство этой гипотезы позволит предположить новую неканоническую цитокинподобную функцию эукариотических АРСаз, связанную с их возможным участием в процессе передачи сигнала.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам отдела И. В. Курочкину, Д. В. Гнатенко, Т. А. Рибчинской, Л. Г. Калачнюк, М. И. Вудмаске, О. В. Леванец, В. Г. Найденову, И. В. Клименко, К. А. Одынцу, а также Г. Х. Мадуке — за постоянное внимание и поддержку этой работы.

А. I. Корнелюк

Структурно-функциональные исследования тирозил-тРНК синтетазы ссавців

Резюме

В огляді представлено основні результати структурно-функціонального дослідження тирозил-тРНК синтетазы ссавців (КФ 6.1.1.1). Розглянуто можливість молекулярних форм ферменту. Вивчено структуру активного центра синтетазы методами хімічних модифікацій і показано суттєву роль залишків лізину і гістидину і цистеїну. Продемонстровано, що до взаємодії з основною формою тирозил-тРНК синтетазы залучається антикодон гомологічної тРНК^{tyr}. Встановлено

специфічні конформаційні зміни ферменту при взаємодії з субстратами, в тому числі з тРНК^{tyr}; виявлено конформаційну адаптацію центрів зв'язування тРНК і АТР. На основі отриманих даних запропоновано динамічну модель функціонування синтетазы. Визначено первинну структуру тирозил-тРНК синтетазы бика шляхом клонування і секвенування кДНК. Запропоновано модульну організацію ферменту: каталитична частина, яка складається зі згортки Россмана та α -спірального домену, з'єднана з цитокин-подібним некаталитичним модулем, спорідненим з РНК. Запропоновано гіпотезу стосовно утворення ізольованого С-домену внаслідок обмеженого протеолізу після активації внутрішньоклітинних протеаз і проявлення цим доменом цитокин-подібної активності, аналогічно цитокіну ЕМАР II.

A. I. Kornelyuk

Structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase

Summary

The main results of the structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase are reviewed. The multiplicity of molecular forms of enzyme is analyzed. Structure of the active site of synthetase has been studied by chemical modification methods and the essential role of lysine, histidine and cysteine residues has been revealed. It was found that the anticodon of homologous bovine tRNA^{tyr} is involved in the interaction with the main form of synthetase in the complex. Conformational changes of enzyme in the course of substrate binding, including tRNA recognition have been revealed. On the basis of the data obtained the dynamical model of functioning of tyrosyl-tRNA synthetase has been proposed. Primary structure of bovine tyrosyl-tRNA synthetase has been determined by cDNA cloning and sequencing. The modular organization of tyrosyl-tRNA synthetase is proposed where the catalytic part of enzyme composed by Rossmann fold and α -helical domain is connected to a cytokine-like C-terminal module. The hypothesis is forwarded about possible forming of the isolated C-domain as a result of the proteolytic digestion after protease activation and about possible cytokine-like activity of this C-domain similar ЕМАР II cytokine.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК. — М.: Наука, 1984. — 405 с.
2. Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs // Ann. Rev. Biochem. — 1987. — 56. — P. 125—158.
3. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes. Structural domains and their implications // Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. — 1991. — 40. — P. 95—142.
4. Kisselev L. L., Wolfson A. D. Aminoacyl-tRNA synthetases from higher eukaryotes // Ibid. — 1994. — 48. — P. 86—142.
5. Akins R. A., Lambowitz A. M. A protein required for splicing group I introns in neurospora mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof // Cell. — 1987. — 50. — P. 331—345.
6. Schray B., Knippers R. Binding of human glutaminyl-tRNA synthetase to a specific site of its mRNA // Nucl. Acids Res. — 1991. — 19, N 19. — P. 5307—5312.
7. Messenguy F., Delforge J. Role of tRNA's in the regulation of several biosyntheses in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem. — 1976. — 67. — P. 335—339.
8. Rapoport E., Zamesnic P. C., Baril E. F. Hela cell DNA

- polymerase α is tightly associated with tryptophanyl-tRNA synthetase and diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate binding activities // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78.—P. 838—842.
9. Mathews M. R., Bernstein R. M. Miosytis autoantibody inhibits histidyl tRNA synthetase: a model for autoimmunity // *Nature.*—1983.—304.—P. 179—180.
 10. Вартанян О. А. Выявление в сыворотках больных аутоиммунными заболеваниями аутоантител против фенилаланил-, тирозил-, триптофанил-тРНК синтетаз и антиидиотипических антител к ним // *Молекуляр. биология.*—1991.—25, № 4.—С. 1033—1039.
 11. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
 12. Гнатенко Д. В., Курочкин И. В., Рибкинська Т. А. и др. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК-синтетазы из печени быка // *Укр. биохим. журн.*—1991.—63, № 4.—С. 61—67.
 13. Курочкин И. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК-синтетазы с высокомолекулярными РНК // *Молекуляр. биология.*—1991.—25, № 3.—С. 779—785.
 14. 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.—7, № 1.—С. 63—69.
 15. Корнелюк А. И. Структурно-функциональное исследование эукариотической тирозил-тРНК синтетазы: Дис. ... д-ра биол. наук.—Киев, 1995—242 с.
 16. Рязанов А. Г., Спирич А. С. Компартментализация биохимических процессов на полирибосомах и других субклеточных структурах // *Успехи биол. химии.*—1988.—29.—С. 3—43.
 17. Спирич А. С., Овчинников Л. П. Компартментализация белков аппарата трансляции на эукариотических полирибосомах // *Перспективы биоорг. химии и молекуляр. биологии.*—М.: Наука, 1986.—С. 59—67.
 18. Alzhanova A. T., Fedorov A. N., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S. Eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase are RNA-binding proteins whereas prokaryotic ones are not // *FEBS Lett.*—1980.—120.—P. 225—229.
 19. Рибкинська Т. А., Вартанян О. А., Филопенко В. В. и др. Метод селекции гибридом, секретирующих моноклональные антитела, основанный на энзиматической активности фермента // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 4.—С. 97—101.
 20. Рибкинська 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.—7, № 5.—С. 33—36.
 21. Рожко О. Т., Корнелюк А. И., Рибкинська Т. А. и др. Получение поликлональных антител к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка и характеристика двух форм фермента // *Укр. биохим. журн.*—1997.—69, № 3.—С. 9—16.
 22. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК-синтетаза из печени быка. Изучение функциональной роли остатков гистидина // *Биоорг. химия.*—1991.—17, № 8.—С. 1033—1037.
 23. Ferst A. R., Knill-Jones J., 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.
 24. 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 // *Докл. АН УССР. Сер. Б.*—1991.—№ 5.—С. 140—143.
 25. 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.—56, № 11.—С. 56—60.
 26. Gnatenko D. V., Kornelyuk A. I., Matsuka G. Ch. One lysine residue of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver is critical for aminoacylation of tRNA^{Tyr} // *Abstrs of 21th FEBS Meet.*—Dublin, 1992.—Suppl.—Tu-180.
 27. Bedouelle H. Recognition of tRNA^{Tyr} by tyrosyl-tRNA synthetase // *Biochimie.*—1990.—72.—P. 589—598.
 28. Калачнюк Л. Г., Корнелюк О. І., Мацука Г. Х. Тирозинова тРНК(Q*ΨA) печінки бика. Визначення ділянок взаємодії з гомологічною аміноацил-тРНК синтетазою методом хімічної модифікації // *Укр. біохим. журн.*—1995.—67, № 5.—С. 60—65.
 29. Schimmel P., Gieger R., Moras D. et al. An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—90.—P. 8763—8768.
 30. 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.—9, № 6.—С. 29—33.
 31. Kornelyuk A. I., Klimenko I. V., Odynets K. A. Conformational change of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase induced by tyrosyl adenylate formation // *Biochem. and Mol. Biol. Int.*—1995.—35, N 2.—P. 317—322.
 32. Perona J., Rould M., Steitz T. Structural basis for tRNA aminoacylation by E. coli glutamyl-tRNA synthetase // *Biochemistry.*—1993.—32, N 34.—P. 8758—8771.
 33. Careri G. The fluctuating enzyme // *Quantum statistical mechanics in the natural sciences.*—New York; London, 1974.—P. 15—35.
 34. Демченко А. П. Равновесная внутримолекулярная подвижность в белках // *Укр. биохим. журн.*—1981.—53, № 4.—С. 114—128.
 35. Демченко А. П. Люмифлюоресценция и динамика белков.—Киев: Наук. думка, 1988.—418 с.
 36. 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.—№ 7.—С. 77—80.
 37. Клименко И. В., Гуца Т. О., Корнелюк А. И. Свойства триптофановой флуоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // *Биополимеры и клетка.*—1991.—7, № 6.—С. 83—88.
 38. 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 // *Abstrs of 22nd Meet. of the FEBS.*—Stockholm, 1993.—P. 190.
 39. Корнелюк О. І. Структурно-динамічна модель функціонування еукариотичної тирозил-тРНК синтетазы // *Тези доповідей II з'їзду Українського біофізичного товариства.*—Харків, 1998.—С. 40.
 40. Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаско М. И. и др. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 5.—С. 66—70.

41. Лёванец О. В., Цайденев В. Г., Вудмаска М. И. и др. Клонирование кДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, с использованием ПИР-амплифицированного радиоактивно меченного гибрида зонда // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 2.—С. 121—126.
42. Лёванец О. В., Найденов В. Г., Одинец К. А. и др. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином ЕМАР II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз // Там же.—№ 6.—С. 474—478.
43. Kao J., Ryan J., Brett G. et al. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // J. Biol. Chem.—1992.—267.—P. 20239—20247.
44. Kao J., Houck K., Fan Y. et al. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II // J. Biol. Chem.—1994.—269.—P. 25106—25119.
45. Tas M. P., Murray J. C. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II // Int. J. Biochem. Cell. Biol.—1996.—28.—P. 837—841.
46. Wilson R., Ainscough R., Anderson K., Baynes C. et al. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans* // Nature.—1994.—368.—P. 32—38.
47. Simos G., Segref A., Fasiolo F. et al. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases // EMBO J.—1996.—15.—P. 5437—5448.
48. 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, N 19.—P. 32573—32579.
49. Cassio D., Waller J.-P. Modification of methionyl-tRNA synthetase by proteolytic cleavage and properties of the trypsin-modified enzyme // Eur. J. Biochem.—1971.—20.—P. 283—300.
50. Goldgur Y., Mosyak L., Reshetnikova I. et al. The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe} // Structure.—1997.—5, N 1.—P. 59—68.
51. Pathak V. K., Nielsen P. J., Truchsel H., Hershey W. B. Structure of the β subunit of translational initiation factor eIF-2 // Cell.—1988.—54.—P. 633—639.
52. Kleeman T. A., Wei D. B., Simpson K. L., First E. A. Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine // J. Biol. Chem.—1997.—272.—P. 14420—14425.
53. Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis // Science.—1986.—234.—P. 364—368.
54. Jacobo-Molina A., Villa-Garcia M., Chen H.-C., Yang D. C. H. Proteolytic signal sequences (PEST) in the mammalian aminoacyl-tRNA synthetase complex // FEBS Lett. 1988.—232.—P. 65—68.

Поступила в редакцию 25.06.98