

И. В. Клименко, Т. О. Гуца, А. И. Корнелюк

СВОЙСТВА ТРИПТОФАНОВОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ДВУХ ФОРМ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ БЫКА

Изучены свойства собственной триптофановой флюоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка с M_r $2 \times 59\,000$ и M_r $2 \times 39\,000$. В рамках модели дискретных структурно-физических классов триптофанилов в белке определены вклады поверхностных и внутренних остатков триптофана в интегральный спектр флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы. Результаты изучения температурной зависимости параметров триптофановой флюоресценции свидетельствуют о том, что при температурах выше 40°C увеличивается индуцированная температурой подвижность отдельных фрагментов белка, изменяющая полярность микроокружения хромофоров. Анализ температурного тухления флюоресценции фермента в координатах $1/q(T)$ и $1/q(T/\eta)$ показал, что подвижность синтетазы в растворе регулируется диффузионными характеристиками растворителя, причем это справедливо как для поверхностных, так и для внутренних участков белка.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы (КФ 6.1.1) катализируют образование аминоацил-тРНК на дорибосомном этапе биосинтеза белка [1]. Высокоспецифичный процесс узнавания аминоацил-тРНК синтетазами гомологичных тРНК является двустадийным процессом, первая стадия которого — рекомбинация фермента и тРНК, вторая — взаимная структурная подстройка синтетазы и гомологичной тРНК [1].

Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка, выделенная нами ранее [2], представляет собой структурный и функциональный димер α_2 -типа с молекулярной массой (M_r) $2 \times 59\,000$. Наряду с основной формой нами также выделена и изучена функционально активная форма тирозил-тРНК синтетазы с меньшей M_r — $2 \times 39\,000$. В данной работе изучены свойства собственной триптофановой флюоресценции этих двух форм тирозил-тРНК синтетазы. Как известно, триптофановые остатки белков являются удобными «репортерными» группами для изучения структуры и конформационных изменений белка в растворе [3].

Материалы и методы. Для исследования использовали препараты бычьей тирозил-тРНК синтетазы, полученные методом, описанным ранее [2]. Форму фермента с M_r $2 \times 59\,000$ выделяли в присутствии двух ингибиторов протеаз: динизопропилфторфосфата (ДФФ) и фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ), а форму фермента с M_r $2 \times 39\,000$ — при использовании только одного ингибитора протеаз ФМСФ. Препараты белков были гомогенными (не менее 92 %) по данным гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии с 0,1 %-ного DS-Na по методу Леммли [4].

Спектры флюоресценции, скорректированные на спектральную чувствительность прибора, регистрировали на серийном спектрофлюориметре Hitachi Model 850 (Япония). Коррекцию спектров осуществляли путем умножения интенсивностей флюоресценции, измеренных через интервал длин волн 5 нм, на соответствующие корректирующие факторы для данных длин волн. В исправленных спектрах флюоресценции величины интенсивностей были пропорциональными числу фотонов, испускаемых за единицу времени в единичном интервале длин волн. Интенсивность флюоресценции измеряли в термостатируемой прямоугольной кварцевой кювете сечением $0,5 \times 0,5$ см; температуру — с помощью хромель-алюмелевой термопары с точностью $\pm 0,2^\circ\text{C}$.

Флюоресценцию возбуждали излучением ксеноновой лампы мощностью 150 Вт. Ширина щели на монохроматорах возбуждения и регистрации 5 нм. Точность определения длины волны ± 1 нм.

Абсолютные значения квантовых выходов флюоресценции определяли сравнительным методом [5], вычисляя площади под спектрами флюоресценции белка и триптофана при данной длине волны возбуж-

дения. Согласно данным Бурштейна [3], квантовый выход флюоресценции триптофана в нейтральных водных растворах при 20 °С равен 0,23. Для расчета абсолютных значений квантового выхода белка (q) была использована формула, предложенная Вернером и Ферстером [6]. Точность определения величин q составила $\pm 10\%$.

Величину эффективности переноса энергии возбуждения между остатками тирозина и триптофана в белке (γ) рассчитывали по формуле, предложенной Тилом и Вебером [7].

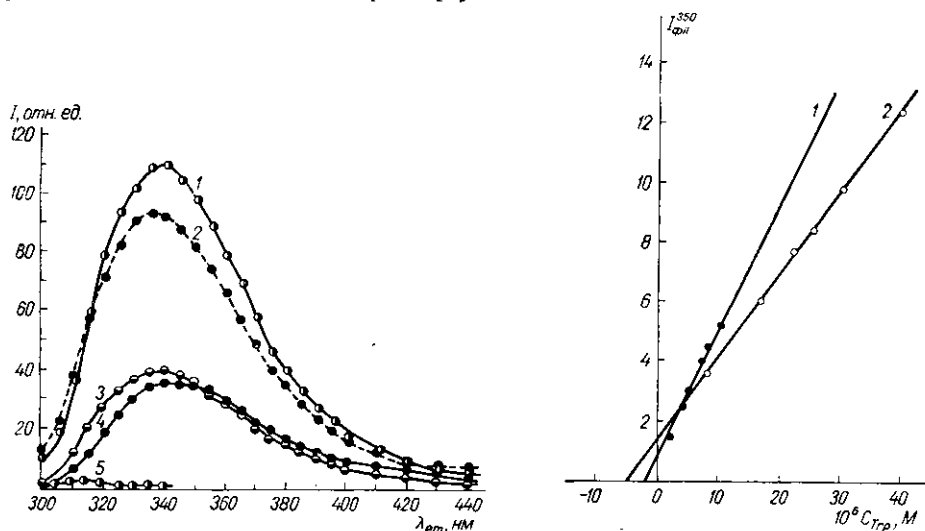


Рис. 1. Спектры флюоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка с M_r $2 \times 59\,000$ (1, 2) и $2 \times 39\,000$ (3, 4); $\lambda_{ex} = 280$ (1, 3) и 296 нм (2, 4); 5 — разностный спектр (1—4) тирозиновой флюоресценции

Рис. 2. Калибровочный график для определения количества остатков триптофана (зависимость интенсивности флюоресценции от концентрации триптофана в растворе тирозил-тРНК синтетазы в 6 М растворе гуанидинхлорида); $\lambda_{ex} = 296$ нм, $\lambda_{max} = 350$ нм, $T = 20$ °С; 1 — M_r $2 \times 59\,000$; 2 — $2 \times 39\,000$

Определение количества триптофановых остатков в белке проводили по методике Пажо [8] с помощью уравнения

$$N = \frac{-b}{1,11 \cdot c}$$

где 1,11 — эмпирический коэффициент; c — концентрация белка; b — величина отрезка, отсекаемого по оси абсцисс калибровочной кривой зависимости интенсивности флюоресценции раствора белка, денатурированного 6 М раствором гуанидинхлорида, с добавлением микроколичеств концентрированного раствора L -триптофана.

Спектры поглощения измеряли на серийном спектрофотометре Shimadzu MPS 2000 (Япония). Оптическая плотность растворов при длине волны 296 нм не превышала 0,05, при этом концентрация белка составляла 0,15—0,20 мг/мл.

В работе использовали L -триптофан («Ajinomoto», Япония) и гуанидинхлорид («Serva», ФРГ).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены спектры флюоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка при температуре 20 °С и длине волны возбуждения 280 и 296 нм. Различие спектров, возбуждаемых при 280 и 296 нм, обусловлено вкладом тирозиновой флюоресценции при возбуждении 280 нм. Спектр тирозиновой флюоресценции, полученный при вычитании нормированных при 380 нм спектров, возбуждаемых при 280 и 296 нм, имеет максимум при 314 ± 1 нм, а вклад тирозиновой флюоресценции в общий спектр излучения белка составляет 5 %. Характеристика собственной флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы приведена в таблице.

Результаты определения количества триптофановых остатков в двух формах фермента, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что в форме фермента, имеющей $M_r 2 \times 59\ 000$, $N = 5,6 \pm 0,9$, а в форме синтетазы с $M_r 2 \times 39\ 000$ $N = 3,3 \pm 0,9$.

Для выяснения локализации триптофановых остатков в молекуле тирозил-тРНК синтетазы использована модель дискретных структурно-физических классов триптофанилов в белке, предложенная Бурштейном [3]. Анализ положения максимума и ширины спектров триптофановой флюоресценции обеих форм фермента показал, что в спектре триптофановой флюоресценции обеих форм тирозил-тРНК синтетазы присутствуют компоненты трех ба-

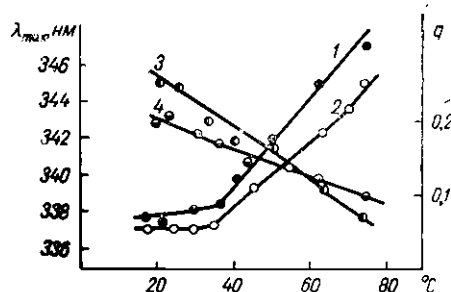


Рис. 3. Зависимость положения максимума (1, 2) и квантового выхода флюоресценции (3, 4) тирозил-тРНК синтетазы из печени быка от температуры; $\lambda_{ex} = 296$ нм; 1, 3 — $M_r 2 \times 59\ 000$; 2, 4 — $2 \times 39\ 000$

зисных классов, рассматриваемых в модели дискретных состояний [9]. Данные анализа представлены в таблице.

Из разложения следует, что для формы фермента, имеющей $M_r 2 \times 59\ 000$, поверхностные остатки триптофана (классы II и III) дают вклад около 68 % в интегральный спектр, тогда как внутренние триптофаны определяют приблизительно 32 % общей флюоресценции. Для функционально активной формы синтетазы ($M_r 2 \times 39\ 000$) вклад поверхностных остатков триптофана снижается до 48 %, а внутренних — увеличивается до 53 % от общего излучения белка.

Результаты измерения температурных зависимостей параметров собственной флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы приведены на рис. 3, 4.

Как видно из рис. 3, при повышении температуры до 40 °C положение максимума спектра флюоресценции фермента не изменяется, а при дальнейшем росте температуры сдвигается в длинноволновую область и достигает 347 ± 1 нм для формы фермента с $M_r 2 \times 59\ 000$ и 345 ± 1 нм для формы синтетазы с $M_r 2 \times 39\ 000$. Смещение максимума спектра

Параметры собственной флюоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка при $T = 20$ °C и возбуждении флюоресценции на длинах волн 280 и 296 нм

Параметр	$M_r 2 \times 59\ 000$		$M_r 2 \times 39\ 000$	
	$\lambda_{ex} = 280$ нм	$\lambda_{ex} = 296$ нм	$\lambda_{ex} = 280$ нм	$\lambda_{ex} = 296$ нм
Положение максимума спектра, λ_{max} , нм	335 ± 1	338 ± 1	337 ± 1	337 ± 1
Ширина спектра, $\Delta\lambda$, нм	56 ± 1	55 ± 1	59 ± 1	57 ± 1
Квантовый выход, q	$0,235 \pm 0,01$	$0,248 \pm 0,01$	$0,163 \pm 0,01$	$0,200 \pm 0,01$
Эффективность переноса энергии триптофан — тирозин, γ	$0,85 \pm 0,1$	—	$0,59 \pm 0,1$	—
Положение максимума тирозиновой флюоресценции λ_{max} , нм	314 ± 1	—	314 ± 1	—
Вклад внутренних триптофанилов в спектр излучения (класс I), a_I	—	$0,32 \pm 0,1$	—	$0,52 \pm 0,1$
Вклад поверхностных триптофанилов в спектр излучения (класс II), a_{II}	—	$0,6 \pm 0,1$	—	$0,24 \pm 0,1$
Вклад поверхностных триптофанилов в спектр излучения (класс III), a_{III}	—	$0,08 \pm 0,1$	—	$0,24 \pm 0,1$

флюоресценции свидетельствует о том, что при температурах выше 40 °С увеличиваются индуцированная температурой подвижность отдельных частей белковой молекулы и число их степеней свободы, приводящие к денатурации белка и изменяющие полярность окружения триптофановых остатков.

Квантовый выход флюоресценции фермента монотонно уменьшается с увеличением температуры от 20 до 75 °С (см. рис. 3). В этой области температур для обеих форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка наблюдается температурное тушение флюоресценции. Анализ

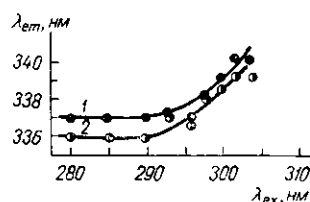
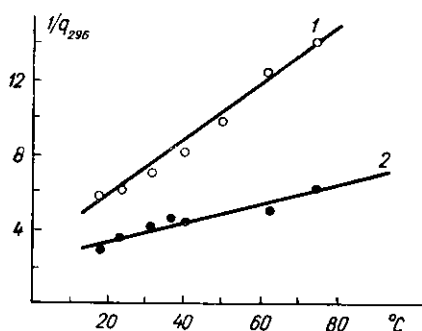
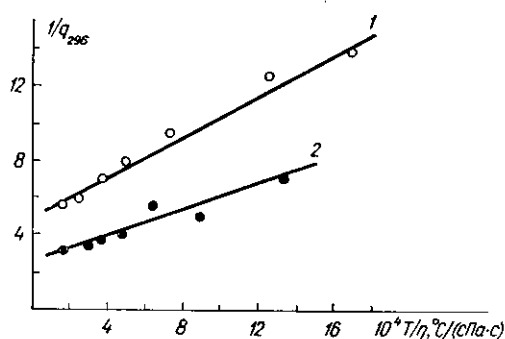


Рис. 5. Зависимость положения максимума спектра триптофановой флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы из печени быка от длины волны возбуждающего излучения: а — M_r $2 \times 59\,000$; б — $2 \times 39\,000$; $T = 27^\circ\text{C}$

Рис. 4. Температурная зависимость квантового выхода флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы из печени быка; $\lambda_{ex} = 296\text{ нм}$; 1 — M_r $2 \times 59\,000$; 2 — $2 \times 39\,000$

зависимостей квантового выхода флюоресценции фермента от температуры проводили согласно формуле, предложенной Бурштейном для белков, содержащих N хромофоров, в работе [3]:

$$q = \frac{1}{N} \sum_j \left\{ 1 / \left[1 - K_{2j} - \sum_i K_{ij}(T) \right] \right\},$$

где K_{2j} — суммарная константа скорости независимых от температуры процессов тушения j -го хромофора; K_{ij} — константы скорости тушащего взаимодействия j -го хромофора i -й группой (все значения констант в этом выражении приведены к величине константы скорости излучательного перехода K_i для индольного хромофора $K_i = 7 \cdot 10^7\text{ с}^{-1}$).

Анализ данных в координатах $1/q(T)$ и $1/q(T/\eta)$ (T , η — температура и вязкость растворителя соответственно) представлен на рис. 4. Линейность этих зависимостей указывает, по-видимому, на то, что подвижность тирозил-тРНК синтетазы регулируется диффузионными характеристиками растворителя, причем это справедливо как для поверхностных, так и для внутренних участков макромолекулы.

Таким образом, кривые температурного тушения флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы отражают температурную зависимость частоты внутримолекулярных столкновений, т. е. температурную зависимость спонтанной и очень быстрой ($t \sim \text{нс}$) подвижности отдельных группировок в белковой глобуле.

В области температур ($T < 40^\circ\text{C}$) исследована зависимость положения максимума спектра триптофановой флюоресценции фермента от

длины волны возбуждающего излучения. Сравнение результатов, полученных при возбуждении на длинах волн 304 и 296 нм, показывает, что небольшие, но хорошо заметные смещения спектров наблюдаются для обеих форм фермента (для формы с M_r $2 \times 59\,000$ — 4 ± 1 нм, для формы синтетазы с M_r $2 \times 39\,000$ — 5 ± 1 нм). Величины длинноволнового сдвига в данном температурном интервале обеих форм тирозил-тРНК синтетазы были максимальными и практически не зависели от температуры (рис. 5). Эти данные могут быть объяснены на основе механизма длинноволнового сдвига спектров флюоресценции при краевом возбуждении [10]. По-видимому, в этом температурном интервале реализуется случай замедленной дипольной релаксации ($\tau_R \gg \tau_F$) окружающей триптофановых остатков, т. е. в течение времени жизни возбужденного состояния хромофора не успевает произойти структурная ориентационная релаксация групп и атомов, окружающих триптофаны в синтетазе.

Авторы выражают свою искреннюю признательность Э. А. Бурштейну за критические замечания, сделанные при обсуждении материалов данной статьи.

Резюме

Вивчено властивості власної триптофаної флюоресценції двох форм тирозил-тРНК синтетази із печінки бика, що мають молекулярну масу M_r $2 \times 59\,000$ та $2 \times 39\,000$. У рамках моделі дискретних структурно-фізичних класів триптофанів у білку визначено вклади поверхневих та внутрішніх залишків триптофану в інтегральний спектр флюоресценції тирозил-тРНК синтетази. Результати вивчення температурної залежності параметрів триптофаної флюоресценції свідчать про те, що при температурах вище 40°C збільшується індукована температурою рухомість окремих фрагментів білка, яка змінює полярність мікрооточення хромофорів. Аналіз температурного гасіння флюоресценції ферменту в координатах $1/q(T)$ і $1/q(T/\eta)$ з'ясував, що рухомість синтетази в розчині регулюється дифузними характеристиками розчинника, причому це справедливо як для поверхневих, так і для внутрішніх ділянок білка.

С и н т а з

The properties of intrinsic tryptophan fluorescence of two forms (molecular weight $2 \times 59\,000$ and $2 \times 39\,000$) of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver have been studied. The contributions of exposed and internal tryptophan residues into fluorescence spectrum of tyrosyl-tRNA synthetase have been determined in terms of the model of discrete structure-physical classes of tryptophan residues in the proteins. The temperature dependence of parameters of tryptophan fluorescence testified that temperature-induced mobility of separate protein fragments increased in temperature range from 40°C to 75°C . Analysis of temperature quenching of enzyme fluorescence in co-ordinate of the $1/q(T)$ and $1/q(T/\eta)$ indicated that the mobility of synthetase in the solution was regulated by diffusion characteristics of the solvent. It is true both for surface and for internal parts of protein.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК.— М.: Наука, 1984.— 408 с.
2. 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.
3. Бурштейн Э. А. Собственная флуоресценция белков (природа и применение) // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1977.— 243 с. (Сер. биофизика; Т. 7).
4. Laemmli A. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227, N 5259.— P. 680—685.
5. Parker C. A., Rees W. F. Correction of fluorescence spectra and measurements of fluorescence quantum efficiency // Analyst.— 1960.— 85, N 1013.— P. 567—600.
6. Werner T. C., Leslie S. Forster. The fluorescence of tryptophyl peptides // Photochemistry and Photobiology.— 1976.— 29.— P. 905—914.
7. Teale F. M., Weber G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acid // Biochem. J.— 1957.— 65, N 3.— P. 476—482.

8. Pajot P. Fluorescence of protein in 6M guanidine hydrochloride. A method for the quantitative determination of tryptophan // Eur. J. Biochem.—1976.—63, N 1.—P. 263—270.
9. Burstein E. A., Vedenkina N. S., Ivkova M. N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // Photochemistry and Photobiology.—1973.—18, N 2.—P. 263—279.
10. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков.— Киев: Наук. думка, 1988.— 278 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 10.06.91

УДК 577.112.5.087

И. И. Парилис, Е. Ю. Казанов, Р. С. Салихов,
Л. Я. Юкельсон, Д. Х. Хамидов

ПАКЕТ ПРИКЛАДНЫХ ПРОГРАММ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ПО ИХ АМИНОКИСЛОТНОМУ СОСТАВУ И ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЕ

В работе предложен метод классификации белков по аминокислотным составам и первичным структурам на основе нового попарного расстояния. Описан пакет прикладных программ для реализации этого метода на IBM-совместимой персональной ЭВМ. Входящие в пакет программы дают возможность сопоставлять полученные для нового расстояния результаты с традиционными. Приводится достаточный критерий для классификации белков.

В настоящее время накоплено большое количество данных о первичных структурах белков и пептидов в различных атласах и банках [1]. Например, в банке PIR (США) более 1,5 миллиона аминокислотных остатков. Сопоставление этих структур для ориентировочного определения функциональной принадлежности белка и восстановления филогенетического древа производится обычно по двум типам расстояний:

1) попозиционное сравнение аминокислот (расчет числа различий в парах гомологично расположенных аминокислотных последовательностей) — расстояние по матрице 0—1;

2) мутационное расстояние (минимальное количество замещений нуклеотидных остатков в цепи ДНК для замены каждой аминокислоты на другую в соответствующей позиции белковой молекулы) — расстояние по матрице 0—3 [1, 2].

При определении этих расстояний для белков различной длины более короткий приходится искусственно «вытягивать» за счет введения в определенные позиции делеций, т. е. «разрывать» исходную структуру. Нами было введено новое расстояние, при расчете которого не приходится «перекраивать» нативную структуру, так как используется не аминокислотная последовательность, а аминокислотный состав сравниваемых белков. Это расстояние, названное «эвклидовым», рассчитывается как квадратный корень из суммы квадратов разности процентного содержания одноименных аминокислот в составах белков. В этом случае каждый белок можно определить в двадцатимерном пространстве точкой, координатами которой являются процентные содержания каждой из 20 аминокислот. Такое унифицированное признаковое пространство было использовано нами для классификации большой выборки (порядка 100) токсических полипептидов и для идентификации новых белков с применением алгоритмов теории распознавания образцов [3—5].

Другим важным преимуществом такого подхода является возможность сопоставления белков с нерасшифрованной первичной структурой

© И. И. ПАРИЛИС, Е. Ю. КАЗАНОВ, Р. С. САЛИХОВ, Л. Я. ЮКЕЛЬСОН, Д. Х. ХАМИДОВ, 1991.