



Структура и функция биополимеров

УДК 577.152.611

И. В. Клименко

ПОЛЯРИЗАЦИЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ И ВЯЗКОСТЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОСТАТКОВ ТРИПТОФАНА ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ

Измерены спектры поляризации собственной флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы из печени быка. Показано, что уменьшение величины поляризации от 0,37 до 0,05 вдоль спектра флюоресценции в длинноволновой области обусловлено изменением эффективности переноса энергии между триптофановыми остатками, обладающими различными спектрами флюоресценции, а также релаксационными процессами, возникающими в микроокружении остатков триптофана после фотовозбуждения. Определены времена жизни флюоресценции синтетазы при комнатных температурах ($\tau = 2,6 - 0,5$ нс, $\lambda_{em} = 337$ нм) в зависимости от длины волны излучения. Используя уравнение Левинсона—Перрена, рассчитана вязкость микроокружения остатков триптофана по спектру излучения, которая уменьшается от 1,3 до 0,05 Па·с в длинноволновой области. Оценена вращательная подвижность остатков триптофана в молекуле синтетазы при разных температурах.

Введение. Тирозил-тРНК синтетаза (КФ 6.1.1.1) представляет собой структурный и функциональный димер α_2 -типа [1]. Кроме основной формы фермента (M_r 2×59 000), выделена также функционально активная протеолитически модифицированная форма (M_r 2×39 000), полностью сохраняющая каталитические свойства в реакции аминокислотирования тРНК^{Tyr} [1, 2]. Известно, что высокоспецифическое узнавание тРНК синтетазой сопровождается взаимными конформационными изменениями синтетазы и тРНК. Для изучения природы изменений конформации аминокислот-тРНК синтетаз перспективным подходом является флюоресцентная спектроскопия.

Ранее нами показано наличие наносекундной конформационной подвижности тирозил-тРНК синтетазы из печени быка в растворе [3]. Свойства собственной триптофановой флюоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка изучены в работе [4].

В данном сообщении представлены результаты анализа поляризации и времен затухания собственной триптофановой флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы из печени быка.

Материалы и методы. Для исследования использовали препараты бычьей тирозил-тРНК синтетазы (форма с M_r 2×39 000), полученной согласно [2]. Препараты белка были гомогенными (не менее 93 %) по данным гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 0,1 %-го DS-Na по методу Леммли [5].

Флюоресценцию измеряли на серийном фазово-модуляционном спектрофлюориметре SLM-4800 (США) в термостатируемой кварцевой прямоугольной кювете сечением $0,5 \times 0,5$ см².

Поляризацию флюоресценции (P) определяли согласно отношению

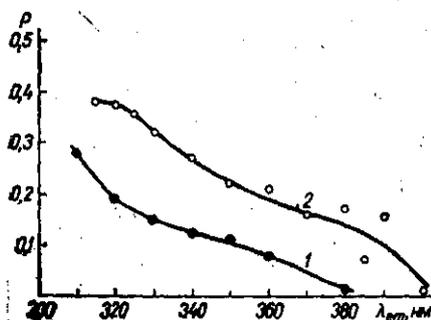
$$P = \frac{H_{vv} - H_{vh} [H_{hv}/H_{hh}]}{H_{vv} + H_{vh} [H_{hv}/H_{hh}]}$$

© И. В. КЛИМЕНКО, 1992

где H — интенсивность испускания; v, h — индексы, указывающие на положение поляризаторов возбуждения и испускания. Поляризаторы в вертикальном (v) или горизонтальном (h) положении.

Времена жизни флюоресценции получены фазово-модуляционным методом как τ -фазовые. Частота модуляции 30 МГц, глубина модуляции 0,33. Точность определения величины времени жизни $\pm 0,5$ нс.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлен ход зависимости степени поляризации P по спектру собственной флюоресценции эукариотической тирозил-тРНК синтетазы. В коротковолновой области спектра испускания степень поляризации максимальна и составляет



0,240 ($\lambda_{ex}=286$ нм) и 0,375 ($\lambda_{ex}=300$ нм) на длине волны 315 нм. С увеличением длины волны испускания наблюдается монотонное снижение степени поляризации по спектру флюоресценции и на длине

Рис. 1. Зависимость степени поляризации флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы из печени быка от длины волны излучения ($t=21^\circ\text{C}$; $\lambda_{ex}=286$ (1) и 300 нм (2))

волны 380 нм она имеет значения 0,20 и 0,15 при $\lambda_{ex}=286$ и 300 нм соответственно. Одновременно с измерением степени поляризации P измеряли время жизни возбужденного состояния (рис. 2). Из данных рис. 2 видно, что при увеличении длины волны флюоресценции происходит монотонное возрастание времени жизни. Так, при длине волны

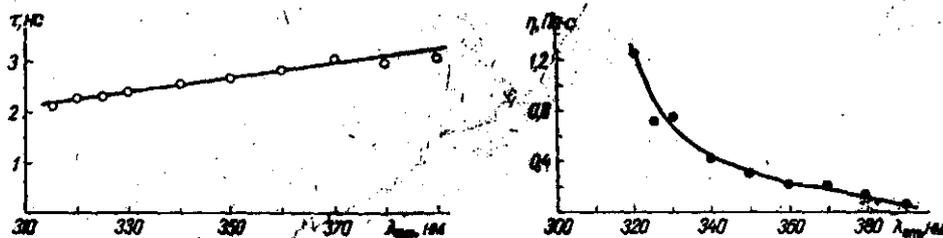


Рис. 2. Зависимость времени жизни возбужденного состояния тирозил-тРНК синтетазы из печени быка от длины волны излучения ($\lambda_{ex}=286$ нм, $t=21^\circ\text{C}$)

Рис. 3. Зависимость величины кажущейся вязкости микроокружения остатков триптофана тирозил-тРНК синтетазы от длины волны излучения ($t=21^\circ\text{C}$)

315 нм $\tau=2,16\pm 0,5$ нс, а при длине волны 380 нм $\tau=2,85\pm 0,5$ нс. Подобная закономерность поведения τ и P по спектру флюоресценции характерна для одно- и мультитриптофансодержащих белков, а также для глициринового раствора DL -триптофана [6, 7]. Главными факторами, приводящими к деполяризации флюоресценции тирозил-тРНК синтетазы в длинноволновой области спектра испускания, являются вращательная подвижность самих остатков триптофана, отдельных сегментов фермента с триптофановыми остатками, а также подвижность фермента как целого при его вращательной диффузии. В течение времени жизни возбужденного состояния фермента (порядка нс) деполяризацию флюоресценции, по-видимому, в основном будет вызывать вращательная подвижность триптофановых остатков, которую в молекуле тирозил-тРНК синтетазы оценивали по формуле, связывающей степень поляризации P с углом поворота Θ [8]:

$$1/P - 1/3 = [1/P_0 - 1/3] \frac{2}{3 \cos^2 \Theta - 1} \quad (1)$$

Используя значение $P=0,29$ при $\lambda_{ex}=300$ нм и $T=18^\circ\text{C}$ в максимуме спектра флюоресценции (337 нм), получаем величину $\Theta=37,57^\circ$. Этот

результат свидетельствует о довольно высокой вращательной подвижности триптофановых остатков в условиях значительной внутривязкой микровязкости тирозил-тРНК синтетазы в наносекундном диапазоне, которая составляет около 0,5 Па·с. На рис. 3 показано изменение значения кажущейся микровязкости околотриптофанового окружения по спектру флуоресценции фермента, рассчитанной по формуле Левшина — Перрена:

$$1/P - 1/3 = [1/P_0 - 1/3] [1 - \tau/\xi]; \quad (2)$$

$$\xi = V\eta/RT,$$

где P_0 — предельная степень поляризации; ξ — время вращательной корреляции флюорофора; T — абсолютная температура; η — вязкость; R — универсальная постоянная; V — объем частицы. При увеличении температуры до 37 °С вращательная подвижность остатков триптофана увеличивается ($\theta = 39,43^\circ$), а микровязкость околотриптофанового окружения уменьшается до 0,36 Па·с. Эти данные свидетельствуют о температурно-индуцированной подвижности отдельных частей белковой молекулы, окружающих триптофановые остатки, и о числе их степеней свободы. Наблюдаемая спектральная неоднородность, в частности, зависимость времени жизни возбужденного состояния от длины волны испускания в тирозил-тРНК синтетазе может быть связана с изменением эффективности переноса энергии между триптофановыми остатками, обладающими различными спектрами флуоресценции. Ранее нами показано, что в спектре тирозил-тРНК синтетазы присутствуют компоненты трех базисных классов, рассматриваемых в модели дискретных состояний триптофанилов в белках [4]. Незначительный вклад в спектральную неоднородность флуоресценции фермента, по-видимому, будет давать вынужденная ориентационная и колебательная релаксация микроокружения триптофановых остатков, обусловленная фотовозбуждением. Времена этого процесса будут меньшими или, в крайнем случае, сравнимыми с временем жизни возбужденного состояния тирозил-тРНК синтетазы.

Автор выражает искреннюю признательность Н. Л. Векшину за помощь, оказанную в проведении экспериментов, а также за обсуждение результатов исследований.

Summary Polarized spectra of intrinsic fluorescence of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver have been studied. It is shown decreasing of polarization value from 0.37 to 0.05 along fluorescence spectrum in long wavelength field was caused both the change of energy transfer efficiency between tryptophanyl residues, having different spectra of fluorescence, and relaxation process which appearing in microenvironment of tryptophanyl residues in enzyme after the photoexcitation. The life time fluorescence of synthetase at room temperature has been determined in depending of emission wavelength ($\tau = 2.6 \pm 0.5$ ns, $\lambda_{em} = 337$ nm). The viscosity of microenvironment of tryptophanyl residues along the emission spectrum, that decreasing from 1.3 to 0.05 Pa·s in long wavelength field has been calculated by Levshin-Perren equation. The torsional mobility of tryptophan residues in enzyme molecule has been estimated at different temperatures.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК синтетазы из печени быка / Д. В. Гнатенко, А. И. Корнелюк, И. В. Курочкин и др. // Укр. биохим. журн. — 1991. — 63, № 4. — С. 25—29.
3. Гуца Т. О., Клименко И. В., Корнелюк А. И. Наносекундная конформационная подвижность тирозил-тРНК в растворе по данным тушения триптофановой флуоресценции // Докл. АН УССР. Сер. Б. — 1990. — № 7. — С. 77—80.
4. Клименко И. В., Гуца Т. О., Корнелюк А. И. Свойства триптофановой флуоресценции двух форм тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Биополимеры и клетка. — 1991. — 6, № 6. — С. 83—88.

5. Laemmli U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—Р. 680—685.
6. Векшин Н. Л. Фотоконформационная релаксация белковой структуры по данным триптофановой флуоресценции // Биофизика.—1987.—32, № 4.—С. 588—591.
7. Векшин Н. Л. Фотоника биологических структур.—Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1988.—164 с.
8. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.—М.: Мир, 1986.—496 с.
9. Туроверов К. К., Кузнецова И. М., Зайцев В. Н. Интерпретация УФ-флуоресценции азурина на основе данных рентгеноструктурного анализа // Биоорг. химия.—1984.—69, № 6.—С. 792—806.

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

Получено 16.08.91

УДК 577.217:337.32

**Сана Сара, Л. Л. Иванов, Г. В. Турковская,
З. П. Мартинкус, М. И. Коваленко, А. В. Ельская**

ВЛИЯНИЕ РИБОСОМ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ

Проведено сравнительное изучение степени термостабильности свободных и ассоциированных с полирибосомами аминоксил-тРНК синтетаз печени кроликов. Показано, что ферменты, выделенные в ассоциированном с полирибосомами состоянии, более устойчивы к тепловой инактивации, чем в свободном. Установлено, что добавление как 80S рибосом, так и 40S и 60S субчастиц рибосом повышает термостабильность лейцил-тРНК синтетазы в составе высокомолекулярного комплекса печени кролика.

Введение. Отличительные особенности эукариотических аминоксил-тРНК синтетаз заключаются в их способности образовывать высокомолекулярные комплексы [1], связываться с высокомолекулярной РНК [2] и ассоциировать с рибосомами [3]. Предполагается [3, 4], что эти эволюционно приобретенные свойства необходимы аминоксил-тРНК синтетазам для их компартментализации в клетке в местах функционирования. Кроме того, показано, что в комплексе с рибосомами они характеризуются повышенной ферментативной активностью [5—7] и термоустойчивостью [8, 9]. Тем не менее вопрос о непосредственном механизме синтетазно-рибосомного взаимодействия остается открытым.

В данной работе проведено сравнительное изучение степени термостабильности четырех свободных и ассоциированных с полирибосомами аминоксил-тРНК синтетаз печени кроликов. Вместе с тем, изучено влияние 80S рибосом и 40S и 60S субчастиц рибосом на термостабильность лейцил-тРНК синтетазы в составе высокомолекулярного комплекса аминоксил-тРНК синтетаз, который, по данным Данга [1], в клетках млекопитающих связан с полирибосомами.

Материалы и методы. Получение полирибосом. Печень кроликов гомогенизировали в двух объемах 0,02 М трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 0,03 М КСl, 0,002 М MgCl₂, 0,25 М сахарозу, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид. Гомогенат центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин в роторе 6X × 25 мл на центрифуге К-25 (Германия) для удаления обрывков клеточек ядер и митохондрий. Надосадочную жидкость фильтровали через четыре слоя стерильной марли, в течение 20 мин обрабатывали раствором, содержащим тритон X-100 (конечная концентрация 2 %) и дезоксихолат натрия (1,3 %), наслаивали на 1 М сахарозу и центрифугировали при 47 000 об/мин в течение 2 ч в роторе Т-50 на центрифуге УЦП-65. Полученные осадки полирибосом суспендировали в буфере для гомогенизации, осветляли центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин. Аминоксил-тРНК синтетазы отделяли от рибосом промыванием 0,05 М трис-НСl буфером (рН 7,5), содержащим 0,5 М КСl, 0,01 М MgCl₂, 0,25 М сахарозу, в течение 20 мин при 4 °С с последующим центрифугированием при 105 000 g в течение 90 мин.

© САНА САРА, Л. Л. ИВАНОВ, Г. В. ТУРКОВСКАЯ, З. П. МАРТИНКУС, М. И. КОВАЛЕНКО, А. В. ЕЛЬСКАЯ, 1992