



Структура и функция биополимеров

УДК 577.152.611

И. В. Клименко, А. И. Корнелюк, Г. Х. Мацука

КОНФОРМАЦИОННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ БЫКА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ГОМОЛОГИЧНОЙ тРНК^{Tyr} ПО ДАННЫМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Флюоресцентный зонд AEDANS ковалентно присоединяли к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка (КФ 6.1.1.1). Стехиометрия связывания составляет около двух молекул зонда на димер фермента. Для измерения расстояний между шестью триптофановыми остатками синтетазы (донор) и ковалентно присоединенным AEDANS (акцептор) использовали синглет-синглетный перенос энергии по Ферстеровскому механизму. В свободном ферменте усредненное расстояние донор—акцептор составляет 2,74 нм. Взаимодействие гомологичной тРНК^{Tyr} с тирозил-тРНК синтетазой из печени быка приводило к увеличению флюоресценции AEDANS-меченного фермента (25 %). После связывания с гомологичной тРНК^{Tyr} среднее расстояние между триптофановыми остатками и зондом AEDANS уменьшилось до 2,53 нм. Гетерологичная тРНК^{Tyr} из *E. coli* не индуцировала таких изменений. Добавление АТФ к комплексу синтетазы с гомологичной тРНК^{Tyr} вызывает дальнейшее увеличение флюоресценции AEDANS (32 %) и сокращение расстояния донор—акцептор до 2,41 нм. Эти результаты свидетельствуют о конформационном изменении эукариотической тирозил-тРНК синтетазы при взаимодействии с гомологичной тРНК^{Tyr}.

Введение. Точность трансляции генетического кода в значительной степени определяется правильным аминоацилизированием тРНК соответствующими аминокислотами (АРСазами) [1]. Узнавание тРНК осуществляется в две стадии: на первой происходит рекомбинация тРНК и АРСазы, на второй — взаимная конформационная адаптация тРНК и фермента [1—3]. Хотя структурная комплементарность является ключевой частью идентификации тРНК, она выражается кинетически в k_{cat} посредством тРНК-индуцированных конформационных изменений АРСаз [4]. Конформационные изменения как тРНК, так и АРСаз в специфических комплексах обнаружены в последнее время с использованием рентгеноструктурных методов исследования кристаллов комплексов [4, 5].

В данной работе изучены конформационные изменения эукариотической тирозил-тРНК синтетазы при взаимодействии с гомологичной тРНК^{Tyr} в растворе с помощью флюоресцентной спектроскопии.

Материалы и методы. Тирозил-тРНК синтетазы из печени быка — димер α_2 с молекулярной массой около 120 000 [6]. Флюоресцентную метку N-[[йодацетил]амино]этил]-5-нафтиламино-1-сульфокислота (AEDANS) ковалентно присоединяли к тирозил-тРНК синтетазе (стехиометрия связывания — 2,24 моль AEDANS на димер фермента). Реакцию модификации проводили в смеси объемом 0,17 мл (23,7 мМ AEDANS, 0,09 мг/мл фермента в 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,8, содержащем 1 мМ MgCl₂ и 1 мМ дитиотреитол). Модифици-

© И. В. Клименко, А. И. Корнелюк, Г. Х. Мацука, 1993

рованный фермент очищали от избытка модификатора гель-фильтрацией на сефадексе G-25 с регистрацией поглощения на серийном микрофлуориметре «Милихром» (Россия). Модификация фермента не приводила к изменению ферментативной активности тирозил-тРНК синтетазы в реакции аминокислотирования тРНК^{Tyr}, определяемой, как описано в [6].

Препараты тРНК^{Tyr} из печени быка получали последовательной хроматографией на ВД-целлюлозе при pH 4,5 (в присутствии 10 mM MgCl₂) и pH 4,5 (в отсутствие MgCl₂), удельная активность составляла 900 пмоль [¹⁴C]-тирозина на 1 ед. A₂₆₀. Использовали также препараты тРНК^{Tyr} из *Escherichia coli* («Boehringer Mannheim», ФРГ).

В работе изучали эффективность переноса энергии возбуждения от триптофановых остатков (шесть остатков на субъединицу фермента) к флуоресцентному зонду AEDANS в рамках теории Ферстера (диполь-дипольное приближение) [7]. Корректность применения данного приближения экспериментально подтверждается отсутствием зависимости эффективности переноса энергии к AEDANS от вязкости растворителя.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi M-850» (Япония) в термостатируемой кварцевой микрокювете (*l* = 0,5 см) при 25 ± 0,1 °C. Спектры поглощения измеряли на серийном спектрофотометре «Shimadzu» (Япония).

При расчетах эффективности переноса энергии были сделаны поправки к значениям квантового выхода фермента, модифицированного AEDANS, на разбавление, экранирование и реабсорбцию флуоресцентного зонда [8]; предполагали, что тушение триптофановой флуоресценции происходит только вследствие безызлучательного переноса.

Эффективность переноса энергии возбуждения (*E*) определяли по формуле [9]

$$E = 1 \sqrt{1 - \frac{q}{q_0}},$$

где *q*₀ и *q* — квантовые выходы донора в отсутствие и присутствии акцептора соответственно.

Расстояние полупереноса энергии (Ферстеровский радиус) рассчитывали по формуле [10]

$$R_0^6 = 8,8 \cdot 10^{-25} K^2 q_0 n^{-4} \nu^{-4} J \text{ (см}^6\text{)},$$

где *K* — фактор взаимной ориентации дипольных моментов переходов донора и акцептора; *n* — показатель преломления среды; *J* — нормированный интеграл перекрытия спектра флуоресценции донора со спектром поглощения акцептора. При расчетах абсолютных значений расстояния полупереноса использовали значение фактора ориентации *K*² = 2/3, соответствующее беспорядочной ориентации доноров и акцепторов за счет вращательной диффузии до переноса энергии [11]. Данное предположение вводит погрешность в величину расстояния донор — акцептор менее 10 %, поскольку поляризация донора [12] и акцептора [13] составляет менее 0,3.

Расстояние между триптофановыми остатками и ковалентно связанным AEDANS в молекуле тирозил-тРНК синтетазы определяли по формуле

$$R^6 = \frac{R_0^6}{E/(1-E)}.$$

Результаты и обсуждение. Рассчитанные величины эффективности переноса энергии (*E*), Ферстеровского радиуса (*R*₀) и расстояния между триптофанами и связанным AEDANS в молекуле фермента (*R*) приведены в таблице.

Экспериментальные зависимости интенсивности флуоресценции связанного с тирозил-тРНК синтетазой AEDANS от концентрации тРНК^{Tyr} показаны на рис. 1. Взаимодействие фермента с гомологичной

тРНК^{Тур} из печени быка сопровождается увеличением интенсивности связанного зонда на 25 %. В то же время взаимодействие с гетерологичной тРНК^{Тур} из *E. coli*, которая не аминоацилируется бычьей тирозил-тРНК синтетазой (неопубликованные результаты), приводит только к слабому тушению (8%) флюоресценции AEDANS. Возгорание флюоресценции зонда в первом случае, по-видимому, происходит за счет увеличения эффективности переноса энергии возбуждения от 81 до 87 %

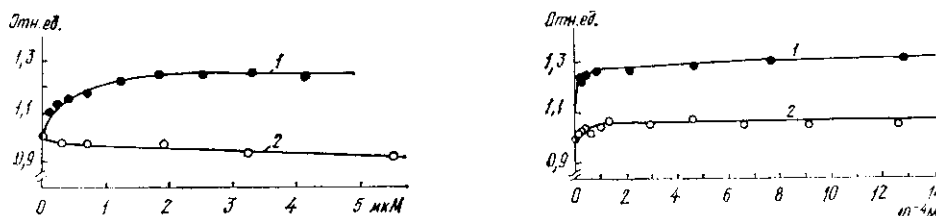


Рис. 1. Зависимость интенсивности флюоресценции AEDANS-меченной тирозил-тРНК синтетазы из печени быка в 0,01 М трис-НСI буфере, рН 7,8, 23 мМ MgCl₂ от концентрации тРНК^{Тур}: 1 — гомологичная тРНК^{Тур} из печени быка; 2 — гетерологичная тРНК^{Тур} из *E. coli*. Здесь и на рис. 2 длина волны возбуждения триптофановой флюоресценции 295 нм, длина волны регистрации флюоресценции связанного AEDANS — 477 нм, $t=25^{\circ}\text{C}$. Концентрация фермента $0,14 \cdot 10^{-6}$ М

Рис. 2. Влияние концентрации АТР на интенсивность флюоресценции AEDANS-меченной тирозил-тРНК синтетазы в комплексе с бычьей тРНК^{Тур} (1) и тРНК^{Тур} из *E. coli* (2). Буфер: 0,01 М трис-НСI, рН 7,8, 2,3 мМ MgCl₂. Концентрация фермента $0,104 \cdot 10^{-6}$ М

от триптофановых остатков к AEDANS. Расстояние между триптофанилами и зондом при взаимодействии синтетазы с гомологичной тРНК^{Тур} уменьшается до 2,53 нм (см. таблицу).

На рис. 2 представлены экспериментальные зависимости интенсивности зондовой флюоресценции комплексов AEDANS-меченной тирозил-тРНК синтетазы с гомологичной и гетерологичной тРНК^{Тур} от концентрации АТР. При добавлении АТР к комплексу фермента с гомологичной тРНК^{Тур} наблюдается увеличение интенсивности флюоресценции зонда на 32 %, тогда как при добавлении его к комплексу фермента с гетерологичной тРНК^{Тур} интенсивность AEDANS возрастает слабо (на 6 %). При взаимодействии АТР со свободным ферментом наблюдается тушение флюоресценции AEDANS на 23 % (неопубликованные данные). Расстояние между триптофановыми остатками и связанным зондом в комплексе синтетазы с гомологичной тРНК^{Тур} и АТР составляет 2,41 нм, эффективность переноса возрастает с 81 до 90 %.

Таким образом, полученные данные показывают, что узнавание тирозил-тРНК синтетазой гомологичной тРНК^{Тур} сопровождается конформационным изменением («сжатием») синтетазы, что приводит к возгоранию флюоресценции зонда в результате увеличения эффективности переноса энергии возбуждения от остатков триптофана. Такое конформационное изменение, по-видимому, затем индуцирует формирование оптимальной конформации для связывания АТР в активном центре синтетазы. Аналогичный эффект недавно описан для кристалла комплекса

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

Объект исследования	λ_{max} , нм	E, %	R_0 , нм	R, нм
AEDANS-ТирРС	477	81	3,5	2,74
AEDANS-ТирРС+тРНК ^{Тур} из печени быка	477	87	3,5	2,53
AEDANS-ТирРС+тРНК ^{Тур} из печени быка+АТР	477	90	3,5	2,41
AEDANS-ТирРС+тРНК ^{Тур} из <i>E. coli</i>	477	82	3,5	2,70
Свободный AEDANS	493	—	—	—

тРНК^{Gln} — глутаминил-тРНК синтетаза *E. coli* в работе [4], где предполагается, что взаимодействие антикодона тРНК^{Gln} с подвижными фрагментами белка «запускает» конформационное изменение, необходимое для последующего связывания АТФ.

Резюме. Флюоресцентный зонд AEDANS ковалентно приеднували до тирозил-тРНК синтетази із печінки бика (КФ 6.1.1.1). Стехіометрія зв'язування складає біля двох молекул зонда на димер ферменту. Для вимірювання відстаней між шістьма триптофановими залишками синтетази (донор) та ковалентно приєднаним AEDANS (акцептор) використовували синглет-синглетний перенос енергії за Ферстеровським механізмом. У вільному ферменті середня відстань донор—акцептор складає 2,74 нм. Взаємодія гомологічної тРНК^{Tyr} з тирозил-тРНК синтетазою з печінки бика призвела до збільшення флюоресценції AEDANS-міченого ферменту (25 %). Після зв'язування з гомологічною тРНК^{Tyr} середня відстань між триптофановими залишками і зондом AEDANS зменшилася до 2,53 нм. Гетерологічна тРНК^{Tyr} із *E. coli* не індукувала таких змін. Додавання АТФ до комплексу синтетази з гомологічною тРНК^{Tyr} викликає подальше збільшення флюоресценції AEDANS (32 %) та скорочення відстані донор—акцептор до 2,41 нм. Ці результати свідчать про конформаційні зміни еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази при взаємодії з гомологічною тРНК^{Tyr}.

Summary. The fluorescent probe 1,5-I-AEDANS was covalently attached to tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver in a nearly stoichiometric amount (2 molecules of probe per enzyme dimer). Singlet-singlet energy transfer has been used for measurement of the apparent distance between 6 tryptophan residues of enzyme and covalently attached 1,5-I-AEDANS. This distance was about 27.4 Å assuming the random orientation of the donor and acceptor from polarization measurements. The interaction of cognate tRNA^{Tyr} with bovine tyrosyl-tRNA synthetase also resulted in the enhancement of fluorescence of AEDANS-labelled tyrosyl-tRNA synthetase (25 %) due to the increase of energy transfer efficiency. After binding of cognate bovine tRNA^{Tyr} the apparent distance between tryptophan residues and AEDANS probe reduced to 25.3 Å. *E. coli* tRNA^{Tyr} which was not aminoacylated by bovine enzyme did not induced these effects. Adding of ATP to the complex of bovine tRNA^{Tyr} and tyrosyl-tRNA synthetase exhibited further enhancement of AEDANS fluorescence by 32 %. In this case the apparent distance between tryptophan residues and AEDANS probe was 24.1 Å. These results are consistent with the conformational change of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase in the course of recognition of cognate tRNA^{Tyr}.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК.— М.: Наука, 1984.—408 с.
2. Riesner D., Pingoud A., Maass G. et al. Distinct steps in the specific binding of tRNA to aminoacyl-tRNA synthetase // Eur. J. Biochem.—1976.—68, N 1.— P. 71—80.
3. Krauss G., Riesner D., Maass G. Mechanism of discrimination between cognate and non-cognate tRNA's by phenylalanyl-tRNA synthetase from yeast // Ibid.—P. 81—93.
4. Rould M. A., Perona J. J., Steitz T. A. Structural basis of anticodon loop recognition by glutaminyl-tRNA synthetase // Nature.—1991.—352, N 6332.— P. 213—218.
5. Cavarelli J., Rees B., Ruff M. et al. Yeast tRNA^{Asp} recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase // Ibid.—1993.—362, N 6416.— P. 181—184.
6. 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.
7. Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler // Annu. Rev. Biochem.— 1978.— 47.— P. 819—846.
8. Ehrenberg M., Cronwall E., Ringler R. Fluorescence of proteins interacting with nucleic acids. Correction for light absorption // FEBS Lett.— 1971.— 18, N 2.— P. 199—203.
9. Grinvald A., Haas E., Steinberg I. Z. Evaluation of the distribution of distances between energy donory and acceptors by fluorescence decay // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—69, N 8.— P. 2273—2277.
10. Wu C.-W., Stryer L. Proximity relationships in rhodopsin // Ibid.— N 5.— P. 1104—1108.

11. Haas E., Katchalski-Katzir E., Steinberg I. Z. Effect of the orientation of the donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization // *Biochemistry*.—1978.—17, N 24.— P. 5064—5070.
12. Клименко И. В. Поляризация флюоресценции и вязкость микроокружения остатков триптофана эукариотической тирозил-тРНК синтетазы // *Биополимеры и клетка*.—1992.—8, № 3.— С. 3—6.
13. Hudson E., Weber G. Synthesis and characterization of two fluorescent sulphydryl reagents // *Biochemistry*.—1973.—12, N 21.— P. 4154—4163.

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

Получено 29.06.93

УДК 535.33:547.963

А. И. Иванов, Е. А. Короленко, Е. В. Королик, В. В. Сарнацкая,
Л. А. Мелешенко, В. Г. Николаев, Р. Г. Жбанков, К. фон Аллен

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ СТРУКТУРЫ АЛЬБУМИНА КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Методами ИК-спектроскопии и кругового дихроизма показано, что при хронической почечной недостаточности не происходит изменений во вторичной структуре сывороточного альбумина человека. Наблюдаемые различия спектров деконволюции сывороточного альбумина больных с ХПН, находившихся на программном хроническом гемодиализе от 0,5 до 5 лет, по сравнению со спектрами деконволюции альбумина здоровых доноров, вероятнее всего, обусловлены изменением микроокружения части боковых радикалов аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также аминокрупп лизиновых остатков в молекулах «уремического» альбумина.

Введение. Сывороточный альбумин человека (САЧ) обеспечивает гуморальный транспорт большого числа органических анионов эндо- и экзогенного происхождения. Это обусловлено наличием в молекуле САЧ по крайней мере пяти классов связывающих центров, специфичных к определенным химическим структурам [1].

Взаимодействие низкомолекулярных лигандов с молекулами альбумина сопровождается локальными конформационными перестройками вблизи аффинных центров САЧ. Последнее увеличивает сродство белка-переносчика к лиганду [2]. В свою очередь, диссоциация комплексов САЧ с транспортируемыми веществами на мембранах клеток-мишеней, по-видимому, также сопровождается конформационными изменениями молекул альбумина [3]. Подобные процессы интенсивно изучаются в модельных экспериментах по комплексообразованию САЧ с жирными кислотами, билирубином, лекарственными препаратами. Однако конформационная изменчивость молекул альбумина в условиях лигандной нагрузки *in vivo* исследована недостаточно. Особенно это относится к различным патологическим состояниям организма, сопровождающимся накоплением в его жидкостных средах липофильных продуктов метаболизма, активно взаимодействующих с транспортными белками. Здесь показано появление модифицированных форм САЧ с пониженной связывающей способностью [4]. Весьма значительные нарушения транспортной функции альбумина обнаружены у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН). Это объясняется накоплением в крови уремических больных различных ингибиторов, конкурентно блокирующих аффинные центры альбумина, либо изменяющих его конформацию [4]. Так, в работе Троицкого с соавт. [5] при изучении САЧ больных с ХПН методами дисперсии оптического вращения и изоэлектрического фокусирования продемонстрирована частичная деспирализация молекул «уремического» альбумина. Однако Сьехолм

© А. И. Иванов, Е. А. Короленко, Е. В. Королик, В. В. Сарнацкая, Л. А. Мелешенко,
В. Г. Николаев, Р. Г. Жбанков, К. фон Аллен, 1993