

Дослідження конформаційної рухливості С-модуля тирозил-тРНК синтетази та його комплексу з тРНК методами часороздільної флуоресцентної спектроскопії

М. О. Кордиш, Г. В. Кирюшко, І. Мелі¹, О. І. Корнелюк

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

¹ Університет Луї Пастера
Страсбург, F-67401, Франція

kordysh_m@yahoo.com

С-модуль тирозил-тРНК синтетази ссавців виконує подвійну функцію: бере участь у зв'язуванні тРНК як цис-фактор та після протеолітичного відщеплення від N-кінцевого каталітичного кора синтетази проявляє ЕМАР II-подібну цитокінову активність. У його структуру входить природний флюорофор Trp144, який, однак, локалізований поза РНК-зв'язувальним сайтом. Методом сайт-спрямованого мутагенезу в РНК-зв'язувальний сайт було введено додатковий флюорофор за рахунок заміни консервативного ароматичного залишку Phe127 на Trp127. Досліджено взаємодію С-модуля з тРНК методами часороздільної флуоресцентної спектроскопії. Порівняльний аналіз параметрів затухання флуоресценції мутантного С-модуля із заміною Phe127 → Trp та його комплексу з тРНК дозволив виявити додаткову короткоіснуючу компоненту триптофанової флуоресценції за присутності нуклеїнової кислоти без суттєвих змін інших параметрів. Отримані дані свідчать про поліморфність мікрооточення залишку Trp127 у комплексі, обумовлену динамічним механізмом взаємодії білка з нуклеїновою кислотою.

Ключові слова: С-модуль тирозил-тРНК синтетази, часороздільна флуоресцентна спектроскопія, конформаційна рухливість.

Вступ. Цитоплазматична тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS) ссавців складається з двох структурних модулів: NH₂-кінцевого каталітичного модуля та цитокіноподібного COOH-кінцевого домену — гомолога цитокіну ЕМАР II (ендотеліального та моноцитарноактивного поліпептиду II) [1, 2]. Некаталітичний С-домен цитоплазматичної TyrRS ссавців має подвійну функцію: бере участь у зв'язуванні тРНК як цис-фактор та після протеолітичного відщеплення від каталітичного кора синтетази прояв-

ляє цитокінову активність, подібну до ЕМАР II [1, 2]. Однак структурні аспекти взаємодії ізольованого С-модуля TyrRS з тРНК, природа конформаційних змін у комплексі та функціональна роль окремих амінокислотних залишків на сьогодні залишаються не вивченими. Раніше ми досліджували власну триптофанову флуоресценцію та конформаційну рухливість ізольованого С-модуля TyrRS з використанням Trp144 як флуоресцентного зонда [3–5].

Встановлено наявність швидкої конформаційної рухливості С-модуля в наносекундному часо-

му інтервалі [3, 5]. Флуоресценція Trp144 є чутливою до конформаційних змін білка: визначено конформаційний перехід мікрооточення Trp144 при тепловій денатурації С-модуля в діапазоні значень температур 40–50 °С [4, 5]. Проте вивчення структурних аспектів взаємодії ізольованого С-модуля з тРНК та природи конформаційних змін у комплексі суттєво обмежувалося тим, що зонд у структурі білка — флюорофор Trp144 — виявився локалізованим поза межами РНК-зв'язувального центра і низькочутливим до взаємодії з нуклеїновою кислотою. Крім того, у попередніх експериментах нами показано, що взаємодія С-модуля з тРНК супроводжується сильною агрегацією білка в розчині, яка суттєво впливає на коректність визначення параметрів зв'язування [6].

У зв'язку з цим для вивчення взаємодії С-модуля з РНК ми замінили консервативний ароматичний залишок Phe127 у РНК-зв'язувальному центрі на флюорофор Trp127 методом сайт-спрямованого мутагенезу [6]. Це дозволило визначити параметри зв'язування С-модуля з тРНК, а також висунути припущення про можливу функціональну роль Trp127 у взаємодії з нуклеїновою кислотою (НК) через стекінгові взаємодії цього ароматичного залишку з основами тРНК. С-модуль TyrRS належить до групи тРНК-зв'язувальних факторів [7–9], до складу якої входить олігонуклеотидзв'язувальна згортка (ОВ-фолд) [10].

Слід зазначити, що всі ОВ-фолд-білки мають в РНК-зв'язувальних центрах консервативні ароматичні залишки, які є функціонально важливими при формуванні комплексів з РНК. тРНК-зв'язувальні фактори, до складу яких входить ОВ-фолд, відзначаються широкою специфічністю відносно зв'язування різних тРНК [7–9], тому для дослідження взаємодії С-модуля і ЕМАР II з РНК як модельну структуру використано тРНК^{Phe}. Отже, мета роботи полягала у вивченні взаємодії С-модуля TyrRS з тРНК методами часороздільної флуоресцентної спектроскопії для вивчення конформаційних змін білка при взаємодії з НК та встановлення можливої функціональної ролі залишку Trp127.

Матеріали і методи. Рекombінантні білки С-модуль TyrRS та С-модуль TyrRS із заміною Phe127 на Trp127 були експресовані у клітинах *Escherichia coli* та очищені до гомогенного стану (> 95 %) за допомогою металохелатуючої хроматографії, як описано раніше [4–6]. Після очищен-

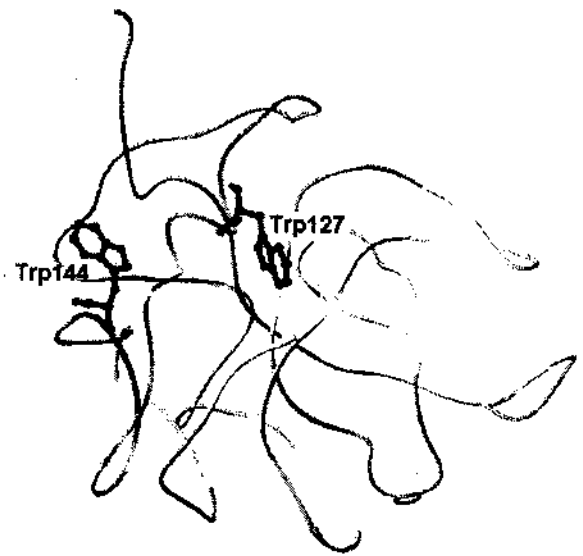


Рис. 1. Просторова структура С-модуля тирозил-тРНК синтетази із заміною Phe127 на Trp127

ня рекombінантних білків відщеплювали His-tag послідовність за допомогою ентерокінази (Enterokinase, light chain, «BioLabs», США).

Використані в роботі розчини білків і тРНК^{Phe} («Sigma», США) для дослідження комплексів білків з НК методами флуоресцентної спектроскопії готували в буфері: 20 мМ трис-НСІ, рН 7,7, який містив 100 мМ NaCl і 5 мМ MgCl₂.

Концентрації білків і тРНК^{Phe} визначали спектрофотометрично, коефіцієнти екстинкції складали: для С-модуля $\epsilon_{280} = 9650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, для С-модуля з мутацією Phe127 → Trp $\epsilon_{280} = 15470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, для тРНК^{Phe} дріжджів $\epsilon_{260} = 500000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Спектри УФ-поглинання вимірювали на спектрофотометрі Spereord UV VIS (VEB «Carl Zeiss», ФРН) у кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см.

Вимірювання з використанням часороздільної флуоресцентної спектроскопії здійснювали в режимі підрахунку одиничних фотонів за допомогою Ti-сапфірового лазера («Tsunami», Spectra-Physics, США), що накачувався аргонним лазером. Довжина хвилі збудження становила 295 нм, довжина хвилі випромінювання — 340 нм, її визначали після проходження поляризатора, орієнтованого під «магічним кутом» 54,7°, щоб уникнути нахилу поляризації, викликаного молекулярним обертянням. Інструментальну функцію відгуку записували з використанням полірованого алюмінієвого дзеркала, вона мала повну ширину напівмаксимуму

Таблиця 1

Параметри затухання флуоресценції Trp144 С-модуля TyrRS у вільному стані та в комплексі з тРНК^{Phe} при різних температурах

Довжина хвилі випромінювання 340 нм	С-модуль TyrRS			С-модуль TyrRS у комплексі з тРНК ^{Phe}		
	τ_i , нс	α_i	f_i	τ_i , нс	α_i	f_i
20 °С	0,217±0,103	0,052±0,031	0,012	0,178±0,042	0,166±0,102	0,038
	0,715±0,021	0,83±0,016	0,650	0,715±0,016	0,737±0,022	0,672
	2,61±0,548	0,118±0,019	0,337	2,409±0,392	0,094±0,007	0,290
37 °С	0,437±0,033	0,819±0,074	0,568	0,500±0,047	0,843±0,026	0,588
	1,812±0,350	0,151±0,080	0,432	1,877±0,234	0,157±0,036	0,412

Примітка. У цій таблиці і в табл. 2 τ_i — час життя флуоресценції; f_i — фракційний внесок кожного часу життя в інтенсивність флуоресценції; α_i — амплітуда компонентів.

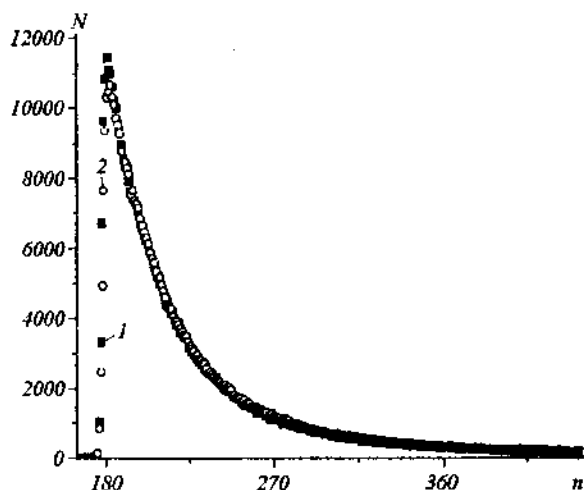


Рис. 2. Затухання флуоресценції С-модуля TyrRS у вільному стані (1) та в присутності тРНК^{Phe} (2) за температури 20 °С (N — кількість накопичених імпульсів; n — номер каналу аналізатора)

порядку 40 пс. Отримані дані із затухання інтенсивності флуоресценції аналізували за допомогою методу максимальної ентропії (MEM) та програми Pulse 5 [11].

Фракційний внесок f_i кожного часу життя в інтенсивність флуоресценції визначали за формулою

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_j \alpha_j \tau_j},$$

де τ_i — час життя флуоресценції; α_i — амплітуда компонентів [12].

Аналіз мікрооточення Trp127 С-модуля із заміною Phe127 → Trp127 проводили за допомогою

вільно поширюваної програми SwissPDB-Viewer 3.7(b2) на основі моделі просторової структури С-модуля см5 [13]. Структура комплексу С-домєну TyrRS (см5) з тРНК^{Phe} (кристалічна структура дріжджової тРНК^{Phe}, PDB ID: 1ENZ) побудована за допомогою програми ZDOCK. Для покращання якості комплексу після докінгу проведено його мінімізацію, при цьому тРНК залишалася жорсткою, а структуру С-модуля мінімізували в полі-тРНК.

Результати і обговорення. У попередніх роботах нами проаналізовано характеристики власної флуоресценції С-модуля TyrRS, обумовленої залишком Trp144 [3–5], а також флуоресценцію С-модуля із заміною Phe127 → Trp (рис. 1), яка визначається двома флюорофорами — Trp144 та Trp127 [6]. Розрахована величина квантового виходу флуоресценції С-модуля з одним флюорофором Trp144 складає $q = 0,09$, а С-модуля із заміною Phe127 на Trp — $q = 0,298$. Отже, власна флуоресценція мутантного С-модуля Phe127 → Trp зумовлена переважно емісією залишку Trp127, локалізованого в РНК-зв'язувальному центрі. Раніше показано, що залишок Trp144 екранований від молекул розчинника і знаходиться в гідрофобному оточенні [3–5], тоді як залишок Trp127 у мутантному білку є частково експонованим до молекул розчинника. Оскільки ароматичні залишки Trp144 та Trp127 мають різне мікрооточення у білковій глобулі, то затухання їхньої флуоресценції з високою ймовірністю буде характеризуватися різним часом життя, який можна бути визначити для кожного окремого флюорофора.

Нами охарактеризовано затухання інтенсив-

Таблиця 2

Параметри затухання флуоресценції С-модуля TyrRS із заміною Phe127 → Trp у вільному стані та в присутності тРНК^{Phe} при різних температурах

Довжина хвилі випромінювання 340 нм	С-модуль TyrRS із заміною Phe127 → Trp			С-модуль TyrRS із заміною Phe127 → Trp у комплексі з тРНК ^{Phe}		
	τ , нс	α	f	τ , нс	α	f
20 °C	—	—	—	0,085±0,013	0,218±0,025	0,013
	0,573±0,021	0,546±0,017	0,149	0,543±0,056	0,453±0,049	0,173
	2,543±0,649	0,092±0,067	0,111	1,799±0,405	0,103±0,043	0,13
	4,315±0,222	0,362±0,071	0,74	4,294±0,148	0,226±0,024	0,683
37 °C	—	—	—	0,063±0,047	0,206±0,011	0,01
	0,429±0,033	0,538±0,074	0,14	0,429±0,234	0,431±0,065	0,142
	2,027±0,350	0,083±0,041	0,102	1,586±0,201	0,08±0,023	0,097
	3,311±0,402	0,379±0,122	0,759	3,449±0,268	0,283±0,073	0,075

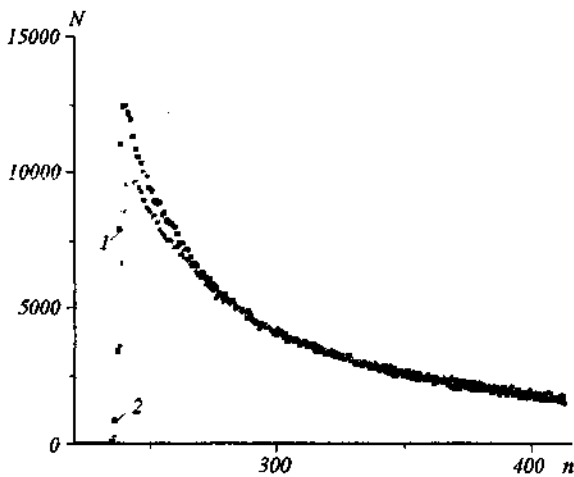


Рис. 3. Затухання флуоресценції С-модуля TyrRS із заміною Phe127 → Trp у вільному стані (1) та в комплексі з тРНК^{Phe} (2) за температури 20 °C (N — кількість накопичених імпульсів; n — номер каналу аналізатора)

ності флуоресценції залишку Trp144 в С-модулі TyrRS у вільному стані та за присутності тРНК^{Phe} при температурах 20 та 37 °C. Отримані експериментальні криві затухання представлено на рис. 2, а розраховані значення параметрів затухання наведено в табл. 1. Як можна бачити, параметри затухання флуоресценції Trp144 в С-модулі у вільному стані і в комплексі з тРНК^{Phe} практично не відрізняються та характеризуються трьома часами життя флуоресценції (τ) за температури 20 °C та двома часами життя флуоресценції — 37 °C. Основний внесок у затухання флуоресценції Trp144 при температурі 2 °C (~65 %) дає компонента з $\tau = 0,7$ нс, а при 37 °C (~57 %) — з $\tau = 0,4$ нс (табл. 1). При температурі 20 °C короткіснучою компо-

ненту з $\tau = 0,2$ нс можна вважати недостовірною, оскільки величина її амплітуди є порівнянною з похибкою розрахунку.

Отже, практична відсутність змін параметрів затухання флуоресценції Trp144 С-модуля в комплексі з тРНК^{Phe} свідчить про нечутливість даного флуорофора до взаємодії з НК, що пояснюється його значною просторовою віддаленістю від сайту зв'язування тРНК (рис. 1).

Наступні дослідження здійснено нами для С-модуля, у якому методами сайт-спрямованого мутагенезу було зроблено заміну консервативного ароматичного залишку Phe127 в РНК-зв'язувальному центрі на флуорофор Trp127.

На рис. 3 показано криві затухання флуоресценції С-модуля із заміною Phe127 → Trp та його комплексу з тРНК^{Phe} при температурі 20 °C, які помітно відрізняються. Параметри затухання флуоресценції мутантного С-модуля із заміною Phe127 → Trp (табл. 2) характеризуються тримодальним розподілом. З урахуванням вищенаведених значень часів життя флуоресценції залишку Trp144 отримані значення довгоіснуючих часів життя флуоресценції С-модуля із заміною Phe127 → Trp можна чітко віднести до кожного із залишків триптофану: 4,3 нс — Trp127; 2,5 нс — Trp144 за температури 20 °C та відповідно 3,3 нс — Trp127 і 2 нс — Trp144 при температурі 37 °C. Важливо зазначити, що в комплексі з тРНК розподіл часів життя флуоресценції білка характеризується появою додаткової короткоіснуючої компоненти з $\tau = 0,09$ нс, внесок якої складає 20 % від загального розподілу (табл. 2) при температурах 20 і 37 °C.

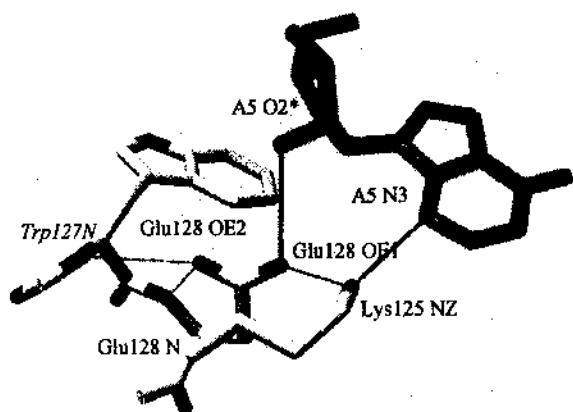


Рис. 4. Водневі зв'язки, що формуються залишком Glu128 С-модуля в комплексі з тРНК, згідно з тривимірною моделлю цього комплексу

Оскільки раніше показано, що Trp144 знаходиться поза сайтом зв'язування з тРНК^{Phe} та параметри затухання його флуоресценції не змінюються за присутності тРНК^{Phe} [6], то поява короткоіснуючої компоненти обумовлена саме додатковим залишком Trp127.

Аналіз параметрів затухання флуоресценції С-модуля з заміною Phe127 → Trp за присутності тРНК свідчить про наявність двох конформаційних популяцій залишків триптофану: ~20 % залишків триптофану зазнає гасіння флуоресценції у присутності тРНК, що зумовлює появу короткоіснуючої компоненти. Подібну гетерогенність популяцій триптофанів можна пояснити динамічним механізмом взаємодії білка з нуклеїновою кислотою, дія цього механізму залежить від конформації білка, яка змінюється у присутності тРНК.

Поява короткоіснуючої компоненти для залишків триптофану може визначатися як стекінгом Trp127 з нуклеотидними основами тРНК, так і конформаційними змінами в структурі білка, обумовленими взаємодією з тРНК^{Phe}.

Безвипромінювальне гасіння флуоресценції залишків триптофану (передача енергії або електрона збудженого стану) супроводжується появою субнаносекундного часу її життя. У білках основними гасниками триптофанової флуоресценції є бічні ланцюги His у протонованій формі, Cys та його дисульфідні містки, Glu і поліпептидний остов [14–16]. У зв'язку з цим ми проаналізували мікрооточення Trp127 у моделі просторової струк-

тури С-модуля см5 [13] та виявили потенційні акцептори електрона збудженого стану, а саме — амінокислотні залишки Glu131, Glu128, Cys63 та Cys81, які знаходяться на відстані до 10 Å від СЕ3 атома індольного кільця триптофану. Гасіння флуоресценції Trp127 С-модуля у комплексі з тРНК бічними ланцюгами зазначених вище амінокислот може реалізовуватися за рахунок виникнення нових ротамерних форм Trp127 внаслідок зміни конформації білка при взаємодії з тРНК.

При вивченні структури комплексу С-модуля з тРНК^{Phe} нами встановлено, що передача електрона збудженого стану від Trp127 С-модуля може відбуватися також альтернативним шляхом. У комплексі С-модуля з тРНК положення карбоксильної групи Glu128 стабілізується чотирма водневими зв'язками (рис. 4), що дає можливість переходу електрона збудженого стану Trp127 на С=О групи Glu128. Це призводить до гасіння флуоресценції Trp127 безвипромінювальним шляхом. Варто зазначити, що такої стабілізації С=О групи Glu128 для С-модуля без тРНК не спостерігається.

Слід зауважити, що в роботі [17] виявлено залежність ефективності гасіння триптофанової флуоресценції С=О групами від відстані між групою-гасником та флюорофором. Це, в свою чергу, суттєво впливає на величину часу життя флуоресценції. А саме — встановлено, що на відстані 5 Å між СЕ3 атомом триптофану та С=О групою час життя короткоіснуючої компоненти триптофанової флуоресценції становить 0,09 нс.

Згідно з просторовою моделлю комплексу С-модуля з тРНК^{Phe} відстань від СЕ3 атома Trp127 до С=О групи Glu128 складає ~4,3 Å. Отже, поява короткоіснуючої компоненти з часом життя 0,09 нс при взаємодії С-модуля з тРНК, найвірогідніше, обумовлена саме передачею електрона від Trp127 до С=О групи Glu128 при утворенні комплексу.

Нами досліджено ефективність флуоресцентного резонансного переносу енергії від Trp144 С-модуля до У-нуклеозиду тРНК^{Phe}, що дозволило оцінити відстань між цими флюорофорами. Виявлено, що параметри спектрів збудження та флуоресценції тРНК^{Phe} не змінювалися у присутності С-модуля. Останнє свідчить про відсутність переносу енергії з Trp144 білка на У-нуклеозид, локалізований в антикодоновій петлі тРНК^{Phe}. Оскільки характерний радіус Ферстера для даної донорно-акцепторної пари становить 1,4 нм, то відсутність переносу енергії свідчить про те, що залишок Trp144 та

У-основа знаходяться на відстані $r > 1,4$ нм. Це добре узгоджується з моделлю комплексу, згідно з якою С-домен TyrRS взаємодіє з акцепторним стеблом та D-петлею тРНК.

Висновки. Проведене дослідження С-модуля TyrRS та його комплексу з тРНК^{Phe} методами часороздільної флуоресцентної спектроскопії дозволило отримати нову інформацію щодо конформаційних змін в оточенні залишків Trp144 та Trp127. Так, незмінність параметрів затухання флуоресценції Trp144 свідчить про його нечутливість до взаємодії з НК: це корелює з даними футпринтингу та молекулярного моделювання про локалізацію даного залишку поза сайтом зв'язування тРНК. Аналіз параметрів затухання флуоресценції С-модуля TyrRS із заміною Phe127 → Trp виявив присутність декількох популяцій залишків триптофану при взаємодії з тРНК. Це свідчить про наявність поліморфності мікрооточення залишку Trp127, обумовленої, швидше за все, динамічним механізмом взаємодії білка з НК та відповідними конформаційними змінами в РНК-зв'язувальному центрі.

Автори висловлюють щирю подяку д-ру Г. Дюпорталю та д-ру Е. Пьемону за надану технічну допомогу у проведенні флуоресцентних вимірювань, а також Д. Б. Ковальському — за побудову моделі комплексу С-модуля з тРНК та обговорення результатів. Роботу виконано за фінансової підтримки гранта № 5.07/200 Державного фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти та науки України.

M. O. Kordysh, G. V. Kyryushko, Y. Mely, O. I. Kornelyuk

Conformational mobility investigation of tyrosyl-tRNA synthetase C-module and its complex with tRNA using the methods of time-resolved fluorescence spectroscopy

Summary

The non-catalytic C-module of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase displays both RNA-binding ability and cytokine activity. C-module contains a unique tryptophan residue (Trp144), located out of RNA-binding site and a conservative aromatic residue Phe127 located inside of its RNA-binding site. Phe127 was replaced by fluorophore Trp127 using the method of site-directed mutagenesis. The interaction of C-module with tRNA was investigated by time-resolved fluorescence spectroscopy. Obtained fluorescence decay parameters of Trp144 and Trp127 of C-module and its complex with tRNA are characterized by the additional short-lived component without any significant changing of other fluorescence parameters in the presence of nucleic acid. These data indicate the existence of the polymorphism of Trp127 microenvironment that is conditioned by the dynamic protein-nucleic acid interaction mechanism.

Keywords: tyrosyl-tRNA synthetase C-module, time-resolved fluorescence spectroscopy, conformational mobility.

M. A. Kordysh, A. V. Kyryushko, I. Mely, A. N. Kornelyuk

Исследование конформационной подвижности С-модуля тирозил-тРНК синтетазы и его комплекса с тРНК методами флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением

Резюме

С-модуль тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих проявляет двойную функцию: участвует в связывании тРНК как цис-фактор и после протеолитического отщепления от N-концевого каталитического кора синтетазы проявляет ЕМАР II-подобную цитокиновую активность. В его структуру входит природный флуорофор Trp144, который, однако, локализован вне РНК-связывающего сайта. Методом сайт-направленного мутагенеза в РНК-связывающий сайт был введен дополнительный флуорофор за счет замещения консервативного ароматического остатка Phe127 на Trp127. Проведено исследование взаимодействия С-модуля с тРНК методами флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением. Сравнительный анализ параметров затухания флуоресценции мутантного С-модуля с заменой Phe127 → Trp и его комплекса с тРНК позволил обнаружить дополнительную короткоживущую компоненту триптофановой флуоресценции в присутствии нуклеиновой кислоты без существенных изменений других параметров. Полученные данные свидетельствуют о полиморфности микроокружения остатка Trp127 в комплексе, обусловленной динамическим механизмом взаимодействия белка с нуклеиновой кислотой.

Ключевые слова: С-модуль тирозил-тРНК синтетазы, флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением, конформационная подвижность.

ПЕРЕКЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dubrovsky A. L., Murray J. C. Cytokine activity of the non-catalytic EМАР-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolimery i kletka.— 1999.—15, № 2.—P. 168—172.*
- Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // Science.— 1999—284.—P. 147—151.*
- Кордыш М. А., Одынец К. А., Корнелюк А. И. Trp144 как флуоресцентный зонд для изучения конформационной подвижности С-модуля эукариотической тирозил-тРНК синтетазы // Біополімери і клітина.—2003.—19, № 5.—С. 436—439.*
- Кордыш М. А., Корнелюк А. И. Мониторинг конформационного изменения окружения флуорофора Trp144 в С-модуле тирозил-тРНК синтетазы при тепловой денатурации // Доп. НАН України.—2004.—№ 1.—С. 156—161.*
- Kordysh M., Kornelyuk A. Conformational flexibility of cytokine-like C-module of tyrosyl-tRNA synthetase monitored by Trp144 intrinsic fluorescence // J. Fluoresc.—2006.—16.—P. 705—711.*
- Кордыш М. О., Корнелюк О. І. Вивчення взаємодії С-модуля тирозил-тРНК синтетазы з тРНК методами флуоресцентної спектроскопії // Біополімери і клітина.—2006.—19, № 5.—С. 436—439.*
- Simas G., Segref A., Fasiolo F., Hellmuth H., Shevchenko A., Mann M., Hurt E. C. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-*

- iRNA synthetase // *The EMBO J.*—1996.—15.—P. 5537—5548.
8. *Kushiro T., Schimmel T.* Trbp111 selectively binds a non-covalently assembled iRNA-like structure // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2002.—99.—P. 16631—16635.
9. *Shalak V., Kaminska M., Mitnacht-Kraus R., Vandenabeele P., Clauss M., Mirande M.* The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component // *J. Biol. Chem.*—2001.—276.—P. 23769—23776.
10. *Murzin A.* OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences // *EMBO J.*—1993.—12.—P. 861—867.
11. *Livesey A. K., J. C.* Analyzing the distribution of decay constants in pulse-fluorimetry using the maximum entropy method Brochon // *Biophys. J.*—1987.—52.—P. 693—706.
12. *Lakowicz J. R.* Principles of fluorescent spectroscopy.—New York: Plenum press, 1999.—698 p.
13. *Каниболоцкий Д. С., Одынец К. А., Скурский С. И., Корнелюк А. И.* Изучение внутримолекулярной подвижности цитокин-подобного С-концевого модуля тирозил-ТРНК синтетазы млекопитающих методом молекулярной динамики // *Фізика живого.*—2003.—11, № 2.—С. 61—71.
14. *Chen Y., Liu B., Yu H.-T., Barkley M. D.* The peptide bond quenches indole fluorescence // *Am. Chem. Soc.*—1996.—118.—P. 9271—9278.
15. *Chen Y., Barkley M. D.* Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins // *Biochemistry.*—1998.—37.—P. 9976—9982.
16. *McMahon L. P., Yu H.-T., Vela M. A., Morales G. A., Shui L., Fronczek F. R., McLaughlin M. L., Barkley M. D.* Conformer interconversion in the excited state of constrained tryptophan derivatives // *J. Phys. Chem.*—1997.—101.—P. 3269—3280.
17. *Sillen A., Hennecke J., Roethlisberger D., Glockshuber R., Engelborghs Y.* Fluorescence quenching in the DsbA protein from *Escherichia coli*: complete picture of the excited-state energy pathway and evidence for the reshuffling dynamics of the microstates of tryptophan // *Proteins.*—1999.—37.—P. 252—263.

УДК 577.322

Надійшла до редакції 30.08.06