

УДК 577.152.611

ФЛУОРЕСЦЕНЦІЯ І ДИНАМІКА МІКРООТОЧЕННЯ ТРИПТОФАНОВИХ ЗАЛИШКІВ ЕВКАРІОТНОЇ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ

Чиста С.В., Корнелюк О.І.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
e-mail: chistayasofia@gmail.com

Надійшла до редакції 23.06.2014

Методом флуоресцентної спектроскопії досліджена внутрішньомолекулярна динаміка N-кінцевого каталітичного модуля (міні-ТурRS) тирозил-тРНК синтетази в розчині. На основі даних флуоресцентної спектроскопії та комп'ютерного моделювання охарактеризовано мікрооточення залишків триптофану та ступінь доступності поверхні Трр40, Трр87 і Трр283 молекулам розчинника. Швидку конформаційну динаміку міні-ТурRS в наносекундному часовому інтервалі визначено за допомогою гасіння флуоресценції міні-ТурRS нейтральним гасником акриламідом, іонами Г та Cs⁺.

Ключові слова: міні-ТурRS, флуоресценція, динаміка білка.

ВСТУП

Тирозил-тРНК синтетаза (ТурRS) ссавців складається з двох структурних модулів: N-кінцевого каталітичного (міні-ТурRS) і C-кінцевого некаталітичного [1]. N-кінцевий модуль (біля 360 а. з.) відповідає вкороченій формі ферменту M_r 2 × 39 кДа, йому притаманна повна ферментативна активність в експериментах *in vitro* [2]. Згідно з сучасними уявленнями, функціональні властивості ферментів можуть бути адекватно описані з точки зору їхньої динаміки в розчині. Механізм дії ферментів визначається їх здатністю до флуктуацій конформації макромолекули, скоректованих у часі. Отже, для розуміння і побудови механізму функціонування ARS необхідні вивчення і опис їх динамічних властивостей у розчині. Розробка цієї проблеми особливо актуальна для ARS еукаріот, у котрих останні схожі за своїми структурою і властивостями з ARS людського організму. ТурRS *B. taurus* виявляє спорідненість до високомолекулярних РНК [3-5] аналогічно багатьом іншим ARS ссавців. Важливо підкреслити, що протеолітично модифікована функціонально-активна форма міні-ТурRS *B. taurus* також частково зберігає РНК-зв'язуючу здатність [2], однак її активність, на відміну від основної форми ензиму, не інгібується рибосомальною РНК [4]. Відповідно сучасним уявленням впізнання тРНК ARS є динамічним процесом, під час якого, як правило, відбувається конформаційна адаптація партнерів комплексу з

наступним утворенням продукту реакції - аміноацил-тРНК [1, 5].

Одним із найбільш інформативних методів дослідження конформаційних особливостей і внутрішньомолекулярної динаміки білків є флуоресцентна спектроскопія [6-8]. Власна флуоресценція білків обумовлена, в основному, залишками триптофану, які є своєрідними зондами в просторовій структурі білка. Завдяки цим зондам можна отримати інформацію про властивості мікрооточення флуорофора, про динаміку білка в розчині, здійснити моніторинг конформаційних змін білка, які мають функціональне значення.

Для дослідження конформаційних змін міні-ТурRS в розчині, в даній роботі охарактеризована власна флуоресценція цього білка і проаналізована його внутрішньомолекулярна динаміка методами флуоресцентної спектроскопії, також проведений аналіз властивостей мікрооточення і особливостей локалізації триптофанових залишків, відповідальних за власну флуоресценцію міні-ТурRS.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єкт досліджень - N-модуль тирозил-тРНК синтетази - був експресований у клітинах *Escherichia coli* і очищений до гомогенного стану (~95%) за допомогою металхелатуючої хроматографії згідно [9].

Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який був обладнаний термостатованим кюветотримачем. Температуру у кюветі визначали з точністю ±0,2°C. Вимірювання проводили у

кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілин для монохроматора збуджуючого світла та реєструючої системи становила 5-10 нм. Довжина хвилі збуджуючого світла дорівнювала 280 та 296 нм, інтервал довжини хвиль для спектрів флуоресценції становив 300-400 нм, реєстрацію флуоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджуючого світла при температурі 25°C. Для зниження впливу випадкових факторів спектри визначали не менше трьох разів. Відтворюваність спектрів флуоресценції по інтенсивності в максимумі була не меншою 98-99%.

Вимірювання спектрів флуоресценції N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS проводили в 20 мМ трис-НСl, 500 мМ NaCl. Використовуваний буфер перевіряли на відсутність флуоресціюючих домішків, записуючи спектр флуоресценції. Будь-яких домішків, флуоресціюючих в досліджуваному спектральному діапазоні 300-400 нм, в буферних розчинах не виявлено.

Перед вимірюванням спектрів флуоресценції досліджуваного білка записували його спектри поглинання на спектрофотометрі BioMate 5 (Велика Британія) у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 1,0 см, об'єм досліджуваного зразка складав 150-200 мкл. Спектри поглинання записували в УФ-області. Концентрацію білка визначали спектрофотометричним способом по поглинанню світла на довжині хвилі 280 нм з урахуванням довжини оптичного шляху і молярного коефіцієнта екстинкції білка ($\epsilon_{280}^{N\text{-модуль}}=77950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

В експериментах по гасінню триптофанової флуоресценції міні-TyrRS вимірювані значення інтенсивності флуоресценції білка з гасниками корегували на коефіцієнт розведення і екранування додаваних в розчин реагентів [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Спектри флуоресценції міні-TyrRS при температурі 25°C і довжинах хвиль збудження 280 та 296 нм представлені на рис. 1. Флуоресценція білка обумовлена випромінюванням як триптофанових, так і тирозинових залишків при збудженні в максимумі спектра поглинання (280 нм). При збудженні на довжині хвилі 296 нм в спектрі флуоресценції ферменту присутня тільки триптофанова компонента.

В первинній структурі субодиниці мономеру міні-TyrRS міститься три триптофанових залишки (Trp40, Trp87 і Trp283) (рис. 2), а також п'ятнадцять залишків тирозину (Tyr39, Tyr52, Tyr79, Tyr96, Tyr97, Tyr123, Tyr129, Tyr134, Tyr166, Tyr176, Tyr198, Tyr204, Tyr289, Tyr292, Tyr341).

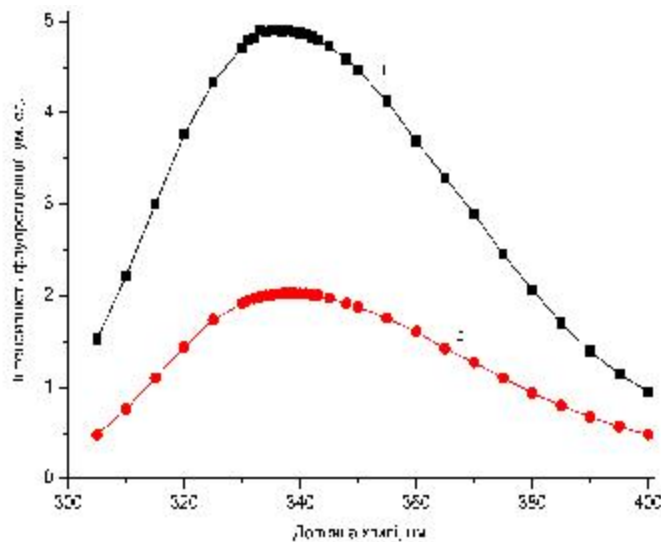


Рис. 1. Спектри флуоресценції міні-TyrRS при довжинах хвиль збудження 280 нм (1) та 296 нм (2).

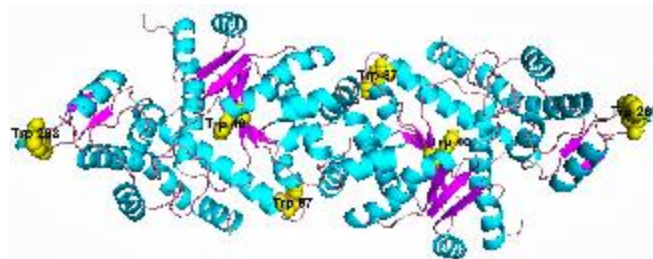


Рис. 2. Локалізація триптофанових залишків в просторовій структурі димеру міні-TyrRS *B. taurus*.

Форма спектрів флуоресценції окремих триптофанових залишків залежить від полярності їх мікрооточення і його здатності релаксувати за час життя збудженого стану триптофанового залишку. Необхідно враховувати, що полярність мікрооточення триптофанового залишку визначається не тільки його доступністю для молекул розчинника, але і власними полярними групами білка, які входять до складу мікрооточення. В роботі візуалізовано і проаналізовано оточення залишків Trp40, Trp87 і Trp283 міні-TyrRS в сфері з радіусом 5 Å (в центрі якої відповідно розміщені ці залишки) за допомогою програми PyMOL 1.3 (рис. 3). Обчислювальний аналіз показав, що в заданій області навколо Trp40 знаходиться 9 амінокислотних залишків: 5 гідрофобних (Val38, Tyr39, Ile71, Leu72, Phe183), 2 гідрофільних (Thr42, Thr70) та 2 нейтральних (Gly41, Gly184); 8 залишків в оточенні Trp87: 5 гідрофобних (Tyr79, Ala85, Leu89, Leu90, Leu131), 2 негативно заряджених залишки (Glu88, Glu91) та нейтральний Pro86; 8 залишків в оточенні Trp283: 3 позитивно заряджених залишки (Arg279, Lys282, His305), 3 негативно заряджених залишки (Asp280, Glu281, Asp308), та 2 нейтральних (Gly284, Gly285). Звичайно приймається, що флуоресцентні

характеристики триптофанових залишків залежать від їх доступності для розчинника. Доступність триптофанових залишків для молекул розчинника залежить не тільки від щільності упаковки мікрооточення триптофанового залишку, але також від його локалізації в макромолекулі білка. Доступність триптофанового залишку залежить від того, розташований він в центрі макромолекули білка чи на її периферії. Відповідно до нашого аналізу, триптофанові залишки міні-TyrRS частково доступні розчиннику. Проведений розрахунок експонованості залишків Trp40, Trp87 і Trp283 в N-кінцевому каталітичному модулі TyrRS за допомогою веб-серверу GetArea (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>). Розрахунок вказує на 8,8% експонованість Trp40; 62,1% експонованість Trp87 і 56,6% експонованість Trp283 в субодиниці А; та на 7,3% експонованість Trp40, 46,1% експонованість Trp87 і 58,1% експонованість Trp283 в субодиниці В, що свідчить про асиметричність субодиниць А і В міні-TyrRS.

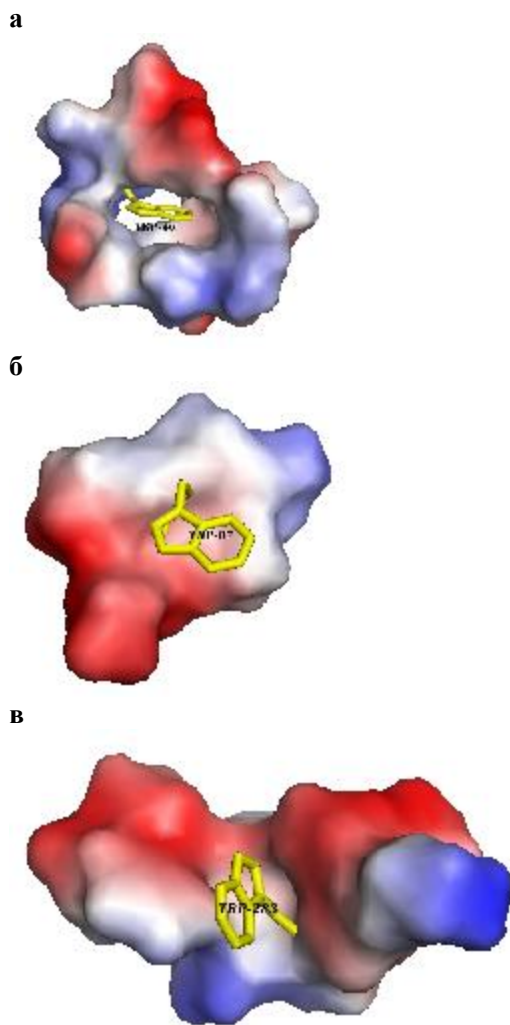


Рис. 3. Електростатичне оточення триптофанових залишків Trp40 (а), Trp87 (б), Trp283 (в).

Визначено відстані до найближчих амінокислотних залишків (від C_{α} відповідного атома Trp до C_{α} атома відповідного залишку), які потрапляють в сфери радіусом 5 Å з центром для залишків Trp40, Trp87, Trp283. Отримані результати вимірювань наведено в таблиці 1.

Для дослідження доступності залишків Trp40, Trp87 і Trp283 в білковій глобулі міні-TyrRS ми використовували метод гасіння флуоресценції білка зовнішніми гасниками (акриламід, Cs^{+} , Γ). Визначено, що при додаванні акриламіду або іонів Cs^{+} та Γ до розчинів досліджуваного білка відбувається гасіння триптофанової флуоресценції. Отримані криві гасіння флуоресценції міні-TyrRS акриламідом, іонами Cs^{+} та Γ представлені на рис. 3 в вигляді залежності відносної інтенсивності флуоресценції I_0/I від концентрації гасника (акриламіду, Cs^{+} , або Γ) (I_0 та I – інтенсивності флуоресценції за відсутності та присутності гасника, відповідно).

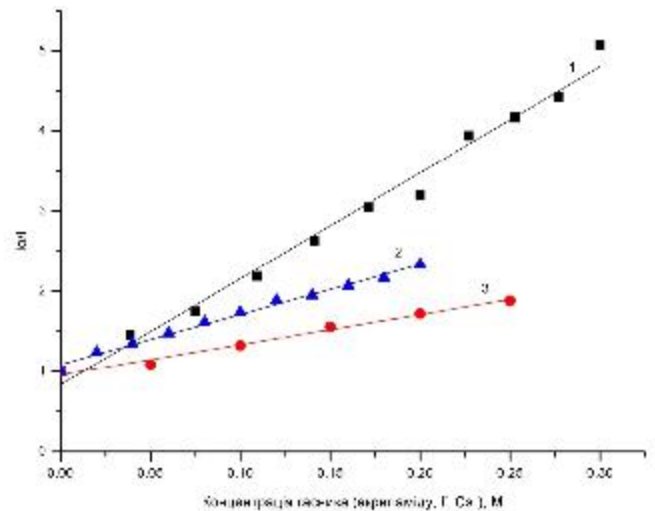


Рис. 4. Графік Штерна-Фольмера гасіння флуоресценції міні-TyrRS акриламідом (1), іонами Γ (2) та Cs^{+} (3) при 25 °С.

Константи гасіння флуоресценції (K_{S-V}) міні-TyrRS визначені на основі нахилу прямої Штерна-Фольмера, значення K_{S-V} становлять: $13.22 \pm 0.5 \text{ M}^{-1}$, $6.26 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}$, $3.75 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}$ для акриламіду, Γ та Cs^{+} відповідно; тоді як для L-Trp K_{S-V} дорівнюють: $16.37 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}$, $12.94 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}$, $2.87 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}$. Ефективність гасіння триптофанової флуоресценції міні-TyrRS іонами Γ , Cs^{+} та нейтральним акриламідом відносно до гасіння флуоресценції L-Trp становить 48%, 129%, 80%, відповідно.

Внутрішні області білків звичайно розглядають як неполярні. Так як, згідно наведених вище даних, Trp40 лише на 8,8% експонований молекулам розчинника в структурі білка, слід очікувати, що цей залишок буде майже недоступний гасникам зовнішньої водневої фази. Це припущення

перевірене за допомогою порівняльного аналізу гасіння триптофанової флуоресценції досліджуваного білка нейтральним гасником акриламідом та іонами Cs⁺ та Г. Відомо, що акриламід гасить переважно експоновані залишки триптофану, але разом з цим, може проникати і в білкові матриці за рахунок їхніх коливань в наносекундному часовому інтервалі. Лінійний характер наведених кривих гасіння (рис. 4) свідчить про динамічний характер гасіння триптофанової флуоресценції. Динамічне гасіння флуоресценції визначається частотою зіткнення між флуорофором та гасником. Для пояснення такої дифузії, можна припустити, що білкова матриця флюктує в наносекундному часовому діапазоні, таким чином, щоб забезпечити проникнення молекули гасника до флуорофора.

Отримані дані по гасінню флуоресценції міні-TyrRS свідчать про те, що триптофанові залишки доступні для всіх трьох гасників, що також підтверджується комп'ютерним аналізом площі

достойної поверхні. Покращену ефективність гасіння триптофанової флуоресценції міні-TyrRS іонами Cs⁺ порівняно з іонами Г можна пояснити негативно зарядженим оточенням деяких триптофанових залишків в структурі білка, що може притягувати катіонні і відштовхувати аніонні гасники. Це припущення підтверджує наш обчислювальний аналіз даних, який показує, що мікрооточення як мінімум з двох залишків Trp містить електронегативні залишки в оточенні: Trp87 (Glu88, Glu91) і Trp283 (Asp280, Glu281, Asp308). Цікаво, що залишки в статичній структурі білка щільно упаковані, однак відносна ефективність гасіння акриламідом висока, і становить 80%. Величина відносної ефективності гасіння флуоресценції свідчить про здатність молекул акриламідом проникати глибоко в структуру білка, що може бути результатом досить великого динамічного коливання структури міні-TyrRS.

Таблиця 1

Відстані від Trp40, Trp87 і Trp283 до найближчих амінокислотних залишків

Залишок, до якого вимірювалася відстань від Trp40	Відстань між атомами, Å	Залишок, до якого вимірювалася відстань від Trp87	Відстань між атомами, Å	Залишок, до якого вимірювалася відстань від Trp283	Відстань між атомами, Å
Val38	6,9	Tyr79	7,6	Arg279	6,3
Tyr39	3,8	Ala85	6,2	Asp280	5,0
Gly41	3,8	Pro86	3,7	Glu281	5,1
Thr42	6,7	Glu88	3,8	Lys282	3,8
Thr70	6,6	Leu89	5,7	Gly284	3,8
Ile71	5,1	Leu90	5,5	Gly285	5,8
Leu72	6,2	Glu91	6,7	His305	9,4
Phe183	5,3	Leu131	25,9	Asp308	10,2
Gly184	6,4				

ВИСНОВКИ

Проведено комп'ютерний аналіз локального оточення флуорофорів: Trp40, Trp87, Trp283 в структурній моделі тирозил-тРНК синтетази. Розрахунок експонованості триптофанових залишків вказує на екранований характер Trp40 (8,8% експонованість), та експонований характер Trp87 (62,1%), та Trp283 (56,6%). Проведено дослідження гасіння триптофанової флуоресценції тирозил-тРНК синтетази іонами Cs⁺, Г та нейтральним гасником акриламідом. Константи Штерна-Фольмера для міні-TyrRS становлять 3,75±0,2 M⁻¹, 6,26±0,2 M⁻¹, 13,22±0,5 M⁻¹ у випадку гасіння іонами Cs⁺, Г та акриламідом, відповідно. Аналіз отриманих даних свідчить про те, що всі три триптофанові залишки

гасяться усіма гасниками. Висока ефективність гасіння екранованого залишку Trp40 свідчить про дифузію гасника крізь білкову матрицю завдяки флюктуаціям білка в наносекундному часовому інтервалі.

ПОДЯКА

Автори висловлюють подяку Драгану А.І. за обговорення результатів.

Література

1. Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Biopolym. Cell. – 1998. – Т. 14, № 4. – С. 349-359.

2. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Рыбкинская Т.А.; Мацука Г.Х. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК синтетазы з печени быка // Укр. биохим. журн. – 1991. – Т. 63, № 4 – С. 61-67.
3. Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мацука Г.Х. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // Мол. биол. - 1988. - Т. 22, №.1 - С. 176-186.
4. Гнатенко Д.В., Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Рыбкинская Т.А., Мацука Г.Х. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК синтетазы з печени быка // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, №4 - С. 61-67.
5. Курочкин И.В., Корнелюк А.И., Мацука Г.Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК синтетазы с высокомолекулярными тРНК // Мол. биол. - 1991. - Т. 25, №.3 - С. 779-785.
6. Francklyn C., Perona J.J., Puetz J., Hou Y.M. Aminoacyl-tRNA synthetases: versatile players in the changing theater of translation // RNA. - 2002. - Vol. 8, № 11. - P. 1363-1372.
7. Демченко А.П. Люминесценция и динамика белков. – Киев: Наукова думка, - 1988. – 418 с.
8. Демченко А.П. Равновесная внутримолекулярная подвижность в белках // Укр. биохимич. журн. – 1981. – 53, №4. – С. 114-128.
9. Демченко О.П., Воловик З.М. Внутрішньомолекулярна динаміка і функція білків // Вісник АН УРСР. – 1988. – №2. – С. 34-41.
10. Дубровский А.Л., Савинская Л.А., Корнелюк А.И. Клонирование и бактериальная экспрессия цитокиноподобного некаталитического домена бычьей тирозил-тРНК синтетазы // Biopolym. Cell. – 1998. – Т. 14, № 5. – С. 449-452.
11. Favicchio R., Dragan A., Kneale G., Read C. Fluorescence spectroscopy and Anisotropy in the Analysis of DNA-Protein interaction // Methods in Molecular Biology. - 2009. - Vol. 543. - P. 589-611.

FLUORESCENCE AND DYNAMICS OF THE MICROENVIRONMENT OF TRYPTOPHAN RESIDUES OF EUKARYOTIC TYROSYL-tRNA SYNTHETASE

Chysta S.V., A.I. Kornelyuk

The intramolecular dynamics of N-terminal catalytic module (mini-TyrRS) tyrosyl-tRNA synthetase in solution was studied using the methods of fluorescence spectroscopy. The microenvironment of tryptophan residues and accessibility of Trp40, Trp87 and Trp283 has been characterized using the fluorescence spectroscopy and computer analysis. The rapid conformational dynamics of mini-TyrRS in nanosecond time scale is revealed using the fluorescence quenching with neutral quencher acrylamide, Γ and Cs^+ ions.

Key words: mini-TyrRS, fluorescence, protein dynamics.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ И ДИНАМИКА МИКРООКРУЖЕНИЯ ТРИПТОФАНОВЫХ ОСТАТКОВ ЭВКАРИОТНОЙ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕАЗЫ

Чиста С.В., Корнелюк А.И.

Методом флуоресцентной спектроскопии изучена внутримолекулярная динамика N-концевого каталитического модуля (мини-TyrRS) тирозил-тРНК синтетазы в растворе. На основании данных флуоресцентной спектроскопии и компьютерного моделирования охарактеризовано микроокружение остатков триптофана и степень доступности поверхности Trp40, Trp87 і Trp283 молекулам растворителя. Быстрая конформационная динамика мини-TyrRS в наносекундном временном интервале определена с помощью тушения флуоресценции мини-TyrRS нейтральным тушителем акриламидом, ионами Γ и Cs^+ .

Ключевые слова: мини-TyrRS, флуоресценция, динамика белка.
