



УДК 577.152.611

І. В. Клименко

ПОЛЯРИЗАЦІЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ ТА В'ЯЗКІСТЬ МІКРООТОЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ ТРИПТОФАНУ ЕУКАРІОТИЧНОЇ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ

Виміряно спектри поляризації власної флюоресценції тирозил-тРНК синтетази з печінки бика. Показано, що зменшення поляризації від 0,37 до 0,05 вздовж спектру флюоресценції у довгохвильовій області обумовлено зміною ефективності перенесення енергії між триптофановими залишками, які мають різні спектри флюоресценції, а також релаксаційними процесами, що виникають у мікрооточенні залишків триптофану після фотозбудження. Визначено терміни життя флюоресценції синтетази при кімнатних температурах ($\tau = 2,6 - 0,5$ нс, $\lambda_{\text{ем}} = 337$ нм) в залежності від довжини хвилі випромінювання. Використовуючи рівняння Левшина — Перрена, розрахована в'язкість мікрооточення залишків триптофану за спектром випромінювання, котра зменшується від 1,3 до 0,05 Па·с у довгохвильовій області. Оцінено обертову рухомість залишків триптофану у молекулі синтетази за різних температур.

Вступ. Тирозил-тРНК синтетаза (КФ6.1.1.1) є структурним і функціональним димером α_2 -типу [1]. Крім основної форми ферменту (M_r $2 \times 59\,000$), виділено також функціонально активну протеолітично модифіковану форму (M_r $2 \times 39\,000$), яка цілковито зберігає каталітичні властивості у реакції аміноацилювання тРНК^{Тур} [1, 2]. Відомо, що високоспецифічне пізнавання тРНК синтетазою супроводжується взаємними конформаційними змінами синтетази і тРНК. Перспективним підходом до вивчення природи змін конформацій аміноацил-тРНК синтетаз у процесі пізнавання тРНК є флюоресцентна спектроскопія.

Раніш нами була показана наявність наносекундної конформаційної рухливості тирозил-тРНК синтетази з печінки бика у розчині [3]. Властивості власної триптофанової флюоресценції двох форм тирозил-тРНК синтетази з печінки бика вивчено у роботі [4].

У даному повідомленні представлено результати аналізу поляризації і термінів згасання власної триптофанової флюоресценції тирозил-тРНК синтетази з печінки бика.

Матеріали і методи. Для дослідження використовували препарати бичої тирозил-тРНК синтетази (форма з M_r $2 \times 39\,000$), отриманої згідно з [2]. Препарати білка були гомогенні (не менш 93 %) за даними гель-електрофорезу у поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності 0,1 %-го DS-Na за методом Леммлі [5].

Флюоресценцію виміряли на серійному фазово-модуляційному спектрофлюориметрі SLM-4800 (США) у термостатованій кварцевій прямокутній кюветі з перетином $0,5 \times 0,5$ см².

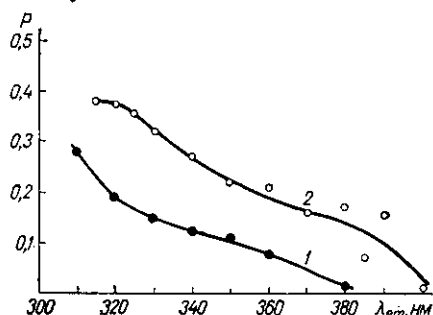
Поляризацію флюоресценції (P) визначали з відношення

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

де H — інтенсивність випромінювання, v , h — індекси, які вказують на положення поляризаторів збудження та випромінювання. Поляризатори у вертикальному (v) або горизонтальному (h) положенні.

Терміни життя флюоресценції отримано фазово-модуляційним методом як τ -фазові. Частота модуляції 30 МГц, глибина модуляції 0,33. Точність визначення терміну життя $\pm 0,5$ нс.

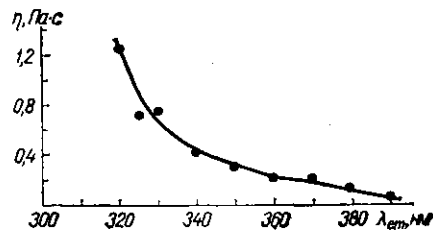
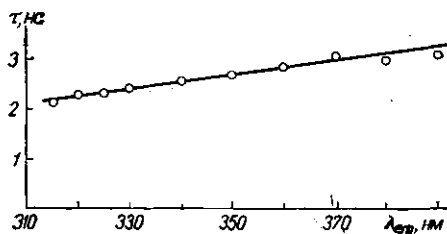
Результати і обговорення. На мал. 1 наведено хід залежності ступеню поляризації P за спектром власної флюоресценції еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази. У короткохвильовій області спектру випромінювання ступінь поляризації є максимальним і складає 0,240 ($\lambda_{ex}=286$ нм) і 0,375 ($\lambda_{ex}=300$ нм), на довжині хвилі 315 нм. Із збільшенням довжини хвилі випромінювання спостерігається монотонне зни-



ження ступеню поляризації є максимальним і складає 0,240 ($\lambda_{ex}=286$ нм) і 0,375 ($\lambda_{ex}=300$ нм), на довжині хвилі 315 нм. Із збільшенням довжини хвилі випромінювання спостерігається монотонне зни-

Мал. 1. Залежність ступеню поляризації флюоресценції тирозил-тРНК синтетази з печінки бика від довжини хвилі випромінювання ($t=21^\circ\text{C}$; $\lambda_{ex}=286$ (1); 300 нм (2))

ження ступеню поляризації за спектром флюоресценції і на довжині хвилі 380 нм він має значення 0,20 і 0,15 при $\lambda_{ex}=286$ і 300 нм відповідно. Одночасно з вимірюванням ступеню поляризації P вимірювали терміни життя збудженого стану (мал. 2). З даних мал. 2 видно,



Мал. 2. Залежність термінів життя збудженого стану тирозил-тРНК синтетази з печінки бика від довжини хвилі випромінювання ($\lambda_{ex}=286$ нм, $t=21^\circ\text{C}$)

Мал. 3. Залежність величини уявної в'язкості мікрооточення залишків триптофану тирозил-тРНК синтетази від довжини хвилі випромінювання ($t=21^\circ\text{C}$)

що із збільшенням довжини хвилі флюоресценції відбувається монотонне зростання терміну життя. Так, за довжини хвилі 315 нм $\tau=2,16\pm 0,5$ нс, а за довжини хвилі 380 нм $\tau=2,85\pm 0,5$ нс. Схожа закономірність поведінки τ і P за спектром флюоресценції є характерною для одно- та мультитриптофанвміщуючих білків, а також для гліцеринового розчину *DL*-триптофану [6, 7]. Головними факторами, які призводять до деполаризації флюоресценції тирозил-тРНК синтетази у довгохвильовій області спектру випромінювання, є обертова рухливість самих залишків триптофану, окремих сегментів ферменту з триптофановими залишками, а також рухливість ферменту як цілого за його обертової дифузії. На протязі терміну життя збудженого стану ферменту (порядку нс) деполаризацію флюоресценції, певно, в основному буде викликати обертова рухливість триптофанових залишків, яку у молекулі тирозил-тРНК синтетази оцінювали за формулою, що пов'язує ступінь поляризації P з кутом повороту Θ [8]:

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

Використовуючи значення $P=0,29$ при $\lambda_{ex}=300$ нм і $T=18^\circ\text{C}$ у максимумі спектру флюоресценції (337 нм), отримуємо величину $\Theta=$

$\approx 37,57^\circ$. Цей результат свідчить про досить високу обертову рухливість триптофанових залишків за умов значної внутрішньобілкової мікро-в'язкості тирозил-тРНК синтетази у наносекундному діапазоні, котра складає біля $0,5 \text{ Па}\cdot\text{с}$. На мал. 3 наведено зміну значення уявної мікро-в'язкості навколотриптофанового оточення за спектром флюоресценції ферменту, розрахованої за формулою Левшина — Перрена:

$$\begin{aligned} 1/P - 1/3 &= [1/P_0 - 1/3] [1 - \tau/\xi]; \\ &= V\eta/RT, \end{aligned} \quad (2)$$

де P_0 — граничний ступінь поляризації; ξ — тривалість обертової кореляції флюорофору; T — абсолютна температура; η — в'язкість; R — універсальна постійна; V — об'єм частки. При збільшенні температури до 37°C обертова рухливість залишків триптофану збільшується ($\Theta = 39,43^\circ$), а мікро-в'язкість навколотриптофанового оточення зменшується до $0,36 \text{ Па}\cdot\text{с}$. Ці дані свідчать про температурно-індуковану рухливість окремих частин білкової молекули, які оточують триптофанові залишки, а також про число їх ступенів свободи.

Спектральна неоднорідність, яку ми спостерігаємо, зокрема, залежність терміну життя збудженого стану від довжини хвилі випромінювання у тирозил-тРНК синтетазі може бути пов'язана із зміною ефективності переносу енергії між триптофановими залишками, котрі мають різні спектри флюоресценції. Раніше нами було показано, що у спектрі тирозил-тРНК синтетази присутні компоненти трьох базисних класів, які розглянуто у моделі дискретних станів триптофанілів у білках [4]. Незначний внесок до спектральної неоднорідності флюоресценції ферменту, мабуть, буде давати вимушена орієнтаційна і коливальна релаксація мікрооточення триптофанових залишків, обумовлена фотозбудженням. Терміни цього процесу будуть меншими або, у крайньому випадку, порівняльними з терміном життя збудженого стану тирозил-тРНК синтетази.

Автор висловлює щиру вдячність Н. Л. Векшину за допомогу, надану у проведенні експериментів, а також за обговорення результатів досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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.
3. Гуца Т. О., Клименко И. В., Корнелюк А. И. Наносекундная конформационная подвижность тирозил-тРНК синтетазы 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.— P. 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.— Пущино: 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.

Ін-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ

Одержано 16.08.91