

Бактеріальна експресія та мічення ізотопами $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ цитокіну ЕМАР II для структурних досліджень методом ЯМР-спектроскопії

Д. М. Ложко, І. Ю. Жуков¹, О. І. Корнелюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

¹Інститут біохімії і біофізики Польської Академії наук
Вул. Павінського, 5а, 02-106 Варшава, Польща

dloshko@ukr.net

Мета. Отримання рекомбінантного цитокіну ЕМАР II в препаративних кількостях з використанням бактеріальної експресії та його ізотопне мічення для дослідження просторової структури методами мультимірної ЯМР-спектроскопії. **Методи.** ЕМАР II експресовано в клітинах *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysE на мінімальному середовищі з міченням ізотопами ^{13}C і ^{15}N та очищено методом метал-хелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозі. Для перевірки маси і чистоти мічених рекомбінантних білків застосовано метод мас-спектрометрії. Одержано двомірні ЯМР-спектри рекомбінантного цитокіну ЕМАР II у розчині. **Результати.** Отримано препарати рекомбінантного білка ЕМАР II, мічені ізотопами ^{13}C і ^{15}N , які проаналізовано методом ЯМР-спектроскопії. **Висновки.** Дисперсія сигналів ЯМР у двомірних спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ і $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQC підтверджує наявність компактної тривимірної структури білка. Ізотопно мічені препарати ЕМАР II зберігають стабільність протягом 5–6 днів, що дає можливість подальшого визначення просторової структури білка в розчині методом ЯМР-спектроскопії.

Ключові слова: цитокін, ЕМАР II, ізотопне мічення, мас-спектрометрія, ЯМР-спектроскопія, двомірні спектри.

Вступ. Цитокін ЕМАР II (endothelial monocyte-activating polypeptide II) – це мультифункціональний поліпептид, який має як цитокінову, так і тРНК-зв'язувальну активність [1]. Його вперше виявлено як фактор, що підсилює прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин людини [2], спричиняє позитивний хемотаксис моноцитів і лейкоцитів, апоптоз у культурі клітин [2, 3], а також виявляє виражену протипухлинну активність [3–5]. Попередником цитокіну ЕМАР II є білок р43 – компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК

синтетаз (АРСа3) у вищих еукаріотів [6]. У цьому комплексі р43 бере участь у білково-білкових взаємодіях з р38, ArgPC і GlnPC. Цитокіну ЕМАР II притаманний високий ступінь гомології за амінокислотною послідовністю (52,7 %) з некаталітичним С-модулем тирозил-тРНК синтетази вищих еукаріотів, який також проявляє ЕМАР II-подібну цитокінову активність: індукуює зростання хемотаксису моноцитів та збільшує рівень експресії тканинного фактора ендотеліальними клітинами людини [7].

Основна функція ЕМАР II-подібних доменів полягає у специфічному зв'язуванні тРНК, причому цей процес визначається наявністю стабільної про-

1.....11.....21.....31.....41.....

1....MNNNNHSSG.LVPRGSGMKE.TAAAKFERQH.MDSPDLGTTDD.DDKAMDSKPI...50

51....DVSRLDLRIG.CIITARKHPD.ADSLVEEVD.VGEIAPRTVV.SGLVNHVPLE...100

101....QMQRNVILL.CNLKPAKMRG.VLSQAMVNCA.SSPEKIEILA.PPNGSVPGDR...150

151....ITFDAPFGER.DKELNPKKKI.WEQIQDLHT.NDEC VATYKG.VPFVKGKGV...200

201....CRAQTMSNSG.IK.....DDDDK (підкреслено)

Рис. 1. Амінокислотна послідовність рекомбінантного білка ЕМАР II, клонована у вектор *pET30a-EMAP II*, перші 43 а. з. якого кодуються вектором *pET-30a* і містять, зокрема, His₆-tag і сайт розщеплення ентерокиназою

сторової структури тРНК [8]. Утворення комплексу тРНК і ЕМАР II супроводжується взаємною конформаційною адаптацією, однак природа таких конформаційних змін залишається практично невивченою. Можливо, реалізація різноманітних функцій ЕМАР II відбувається у різних конформаціях білка, але ця гіпотеза не підтверджена експериментально. Локальні конформаційні зміни ЕМАР II при утворенні комплексу з тРНК виявлено нами раніше за допомогою методу флуоресцентної спектроскопії [9, 10]. Кристалічна структура ЕМАР II, встановлена методом рентгеноструктурного аналізу [11], не дає інформації про конформаційну рухливість білка, яка має функціональне значення. Останнім часом широкого розповсюдження для визначення просторової структури білків у розчині та їхньої динаміки набув метод ЯМР-спектроскопії [12].

У даній роботі для вивчення просторової структури ЕМАР II і його динаміки в розчині методами ЯМР-спектроскопії проведено ізотопне мічення білка ізотопами ¹³C і ¹⁵N та отримано двомірні спектри ЯМР ¹H/¹⁵N і ¹³C/¹⁵N- HSQC, які підтверджують наявність компактної тривимірної структури білка та її стабільність у розчині.

Матеріали і методи. Експресія рекомбінантних білків. Використано клітини *Escherichia coli* штаму BL21(DE3)pLysE та вектор для бактеріальної експресії *pET-30a* («Novagen», США), який містить селективний ген стійкості до антибіотика канаміцину. Амінокислотну послідовність білка ЕМАР II представлено на рис. 1.

Мінімальне середовище А (на 200 мл): 20 мл 10 × М9 солі; 200 мг [¹⁵N]-NH₄Cl; 2 мл 100 × розчину мікроелементів; 200 мкл 2 М MgSO₄; 20 мкл 1 М CaCl₂; 400 мг [¹³C]-глюкози; 200 мкл 1 мг/мл біотину; 200 мкл 1 мг/мл тіаміну; 200 мкл 30 мг/мл ка-

наміцину. Агаризоване (1,5 %) мінімальне середовище А готували з додаванням 1,5 г агару на 100 мл рідкого середовища. Солі середовища М9 (наважки на 1 л): 60 г Na₂HPO₄; 91 г Na₂HPO₄·12H₂O; 30 г KH₂PO₄; 5 г NaCl. Склад 100 × розчину мікроелементів (наважки на 1 л): 5 г ЕДТА; 830 мг FeCl₃·6 H₂O; 84 мг ZnCl₂; 13 мг CuCl₂·2H₂O; 13 мг CoCl₂·6 H₂O; 10 мг H₃BO₃; 1,6 мг MnCl₂·6 H₂O. Використано солі і компоненти буферів кваліфікації «ос. ч.» і «х. ч.».

Компетентні клітини *E. coli* штаму BL21(DE3) pLysE трансформували плазмідом *pET-30a/EMAP II* та висівали на чашку Петрі з агаризованим мінімальним середовищем А. Одиночну колонію штаму-продуцента інокулювали в 5 мл середовища А, яке містило антибіотик канаміцин (концентрація 30 мкг/мл) і культивували за температури 37 °С (120 об/хв упродовж ночі). Після цього нічну культуру додавали до 195 мл свіжого мінімального середовища А, що містило антибіотик канаміцин та [¹³C]-глюкозу і [¹⁵N]-хлорид амонію. Біомаса росла за *t* = 37 °С в установці для культивування клітин ES-20 («BIOSAN», Латвія) при швидкості 250 об/хв. Після досягнення оптичної густини $OD_{600} = 0,7-0,8$ індукували транскрипцію гена цільового білка додаванням розчину ізопропіл-β-тіогалактопіранозиду (ІПТГ), кінцева концентрація якого в клітинній культурі становила 1 мМ. Інкубацію проводили протягом 4 год (37 °С, 250 об/хв). Далі клітини осаджували центрифугуванням при 4500 об/хв протягом 30 хв на центрифугі «К-23» і клітинний осад заморожували за *t* = -20 °С.

Для отримання клітинного лізату осад розморожували і всі подальші маніпуляції здійснювали за *t* = 0 °С на льодовій бані. Лізис клітин проводили у 15 мл 50 мМ натрій-фосфатного буфера, який містив 500 мМ NaCl, 10 мМ ДДТ, 10 мМ імідазол, з

додаванням 0,1 мМ PMSF та лізоциму до кінцевої концентрації 0,1 мг/мл. Отриману гомогенну суспензію озвучували на ультразвуковому сонікаторі 10 разів по 10 с та центрифугували при 6000 g (12000 об/хв) 2 рази по 15 хв на мікроцентрифузі «Sigma 1–13».

Афінна хроматографія на Ni-NTA-агарозній колонці. Супернатант, отриманий після центрифугування (клітинний екстракт), наносили на Ni-NTA-агарозну колонку («Qiagen», США) об'ємом 2 мл, врівноважену буфером для лізису. Колонку ретельно промивали 50 мМ натрій-фосфатним буфером, рН 8, що містив 500 мМ NaCl, 10 мМ ДДТ, 20 мМ імідазол. Цільовий білок отримували після елюції трьома об'ємами буфера для елюції (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8, 300 мМ NaCl, 10 мМ ДДТ) у лінійному градієнті концентрації імідазолу від 100 до 300 мМ. Фракції, які містили цільовий білок, об'єднували і діалізували проти 50 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 8,0, 250 мМ NaCl, 10 мМ ДДТ. Концентрацію препаратів білка визначали по спектрах УФ-поглинання та методом Бредфорда [13].

Остаточне концентрування препаратів здійснювали на мікроконцентраторах («Millipore», Франція) згідно з інструкцією.

Чистоту отриманих препаратів білка ЕМАР II перевіряли методом електрофорезу за денатуруючих умов у присутності додецилсульфату натрію в 15 %-му поліакриламідному гелі за Леммлі [14] з використанням суміші маркерних білків («Fermentas», Литва).

Протеоліз рекомбінантних білків ентерокіназою. Після виділення рекомбінантних білків відщеплювали послідовність His₆-tag за допомогою ентерокінази («New England BioLabs», Велика Британія). Реакційна суміш містила 50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 250 мМ NaCl, 10 мМ ДДТ, 2 мМ CaCl₂, рекомбінантний білок та ентерокіназу з розрахунку 0,00016 мкг ентерокінази на 25 мкг білка. Протеоліз проводили протягом 18–24 год за $t = 4$ °C.

Реакційну суміш після протеолізу наносили на Ni-NTA-агарозну колонку, врівноважену реакційним буфером (без іонів хлориду кальцію), та інкубували при 4 °C протягом 60 хв. Відщеплені послідовності His₆-tag залишалися зв'язаними на колон-

ці. Повноту проведеного протеолізу та чистоту рекомбінантного білка визначали за допомогою ПААГ у денатуруючих умовах.

Аналіз фізико-хімічних властивостей. Фізико-хімічні властивості рекомбінантного ЕМАР II передбачено програмою ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>): молекулярна маса 18535 Да; ізоелектрична точка pI = 6,36; сумарна формула – C₈₁₀H₁₃₂₆N₂₂₆O₂₄₅S₁₂; повна кількість атомів становить 2619; коефіцієнт молярної екстинкції при 280 нм – 8730 М⁻¹см⁻¹; оптичне поглинання 0,1 %-го розчину – 0,471.

Спектрофотометричне визначення концентрації білка. Спектри УФ-поглинання рекомбінантного білка ЕМАР II вимірювали за допомогою спектрофотометра BioMate-5 («Termo Scientific», Велика Британія) у кварцових прямокутних кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см.

Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за поглинанням на довжині хвилі 280 нм (A_{280}) з урахуванням довжини оптичного шляху (L) і коефіцієнта екстинкції білка $\epsilon_{280}^{\text{EMAP II}} = 8730 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [15].

Мас-спектрометрія. Для перевірки маси та чистоти мічених рекомбінантних білків застосовано метод мас-спектрометрії з іонізацією електроспреєм. Маси вимірювали на мас-спектрометрі Q-TOF Micromass («Waters», США).

ЯМР-спектроскопія. Всі експерименти ЯМР проводили за температури 20 °C на ЯМР-спектрометрі Varian VNMRS 800 (резонансна частота ^1H 800 МГц), обладнаному трьома частотними каналами ^1H , ^{13}C , ^{15}N та одиницею Z-градієнта. Спектри ЯМР оброблено за допомогою програми NMRPipe [16] і проаналізовано з використанням програмного забезпечення Sparky [17].

Результати і обговорення. Здійснено бактеріальну експресію мічених ізотопами ^{13}C і ^{15}N препаратів рекомбінантного білка ЕМАР II за оптимізованим протоколом. Основними вимогами до зразків мічених білків для досліджень методами ЯМР-спектроскопії є збереження нативної конформації білка при високих концентраціях (0,5–1,2 мМ) в об'ємі, не меншому за 330 мкл, та стабільність препарату протягом 5–6 днів. Препарати білка не повинні містити парамагнітних іонів та органічних домішок.

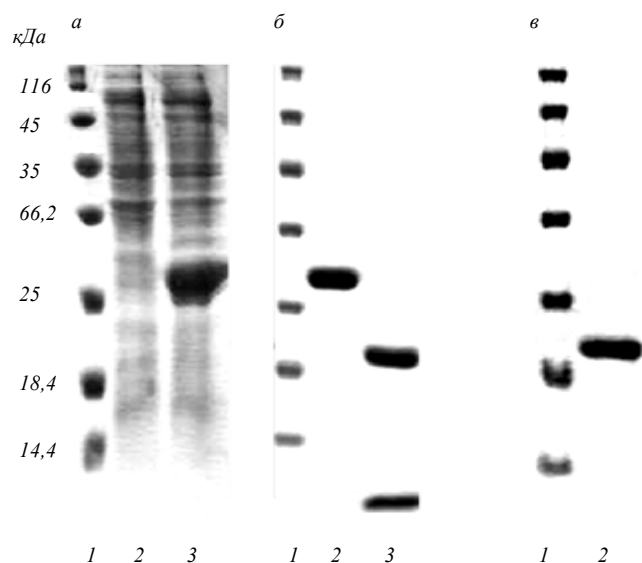


Рис. 2. Гель-електрофорез (15 %-й) подвійно міченого ізотопами $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ЕМАР II; а: 1 – білкові маркери; 2 – лізат до індукції; 3 – лізат після індукції; б: 1 – білкові маркери; 2 – рекомбінантний білок ЕМАР II; 3 – рекомбінантний білок ЕМАР II після протеолізу ентерокіназою та відщеплена His_6 -tag-послідовність; в: 1 – білкові маркери; 2 – очищений ЕМАР II з відщепленою His_6 -tag-послідовністю

щення цільового білка дозволили отримати високоочищений препарат ЕМАР II. Аналіз препаратів білка ЕМАР II методом гель-електрофорезу за денатуруючих умов показав їхню високу гомогенність і чистоту (не менше 98 %) (рис. 2). Вихід білка становив 8–10 мг із 200 мл суспензії клітин *E. coli*, що є досить високим виходом для цієї системи експресії (Novagen pET System Manual, 10th Edition). При цьому білок є розчинним і не утворює агрегатів. Значний вихід білка свідчить про відсутність таких проблем білкової експресії, як токсичність для клітин *E. coli*, нестабільність, неправильний процесинг і неефективна трансляція білка. Препарати ЕМАР II в концентрації 0,3–0,5 мМ добре витримували інтенсивний діаліз, який проводили для вилучення імідазолу та органічних домішок проти 50 мМ натрій-фосфатного буфера (pH 8,0, 250 мМ NaCl, 10 мМ ДДТ), та подальше концентрування на мікроконцентраторах.

Мас-спектри рекомбінантного білка ЕМАР II, міченого ізотопами ^{15}N і $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, свідчать про високий ступінь чистоти препаратів та відповідність мо-

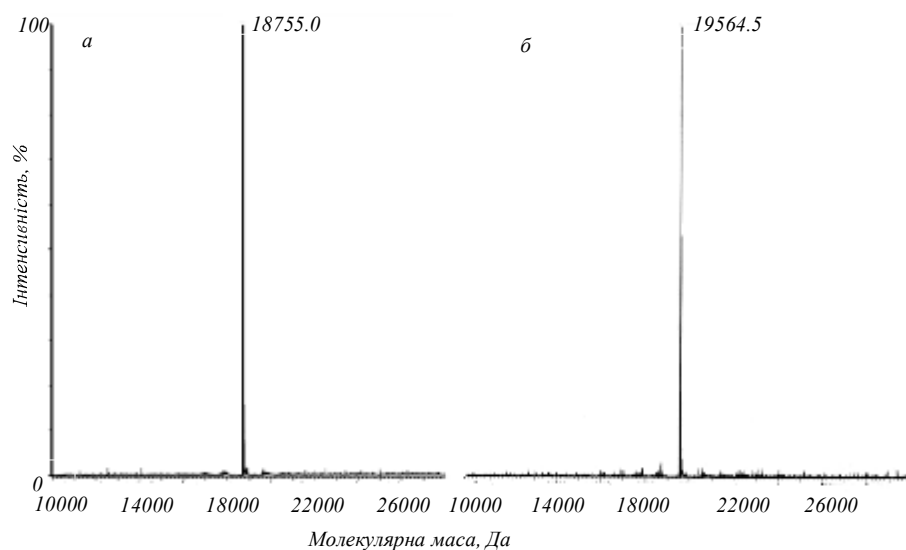


Рис. 3. Q-ToF мас-спектрометрія ЕМАР II: а – мас-спектр ЕМАР II, міченого ізотопом ^{15}N (молекулярна маса становить 18755,0 Да); б – мас-спектр ЕМАР II, подвійно міченого ізотопами ^{13}C та ^{15}N (молекулярна маса 19564,5 Да)

Рекомбінантний білок ЕМАР II на N-кінці містить специфічну послідовність довжиною 43 а. з., яка кодується вектором і включає гексагістидинову послідовність (His_6 -tag), що дало змогу отримати високоочищені препарати білка методом афінної метал-хелатуючої хроматографії. Відщеплення His_6 -tag послідовності ентерокіназою та наступне очи-

щення цільового білка дозволили отримати високоочищений препарат ЕМАР II. Аналіз препаратів білка ЕМАР II методом гель-електрофорезу за денатуруючих умов показав їхню високу гомогенність і чистоту (не менше 98 %) (рис. 2). Вихід білка становив 8–10 мг із 200 мл суспензії клітин *E. coli*, що є досить високим виходом для цієї системи експресії (Novagen pET System Manual, 10th Edition). При цьому білок є розчинним і не утворює агрегатів. Значний вихід білка свідчить про відсутність таких проблем білкової експресії, як токсичність для клітин *E. coli*, нестабільність, неправильний процесинг і неефективна трансляція білка. Препарати ЕМАР II в концентрації 0,3–0,5 мМ добре витримували інтенсивний діаліз, який проводили для вилучення імідазолу та органічних домішок проти 50 мМ натрій-фосфатного буфера (pH 8,0, 250 мМ NaCl, 10 мМ ДДТ), та подальше концентрування на мікроконцентраторах.

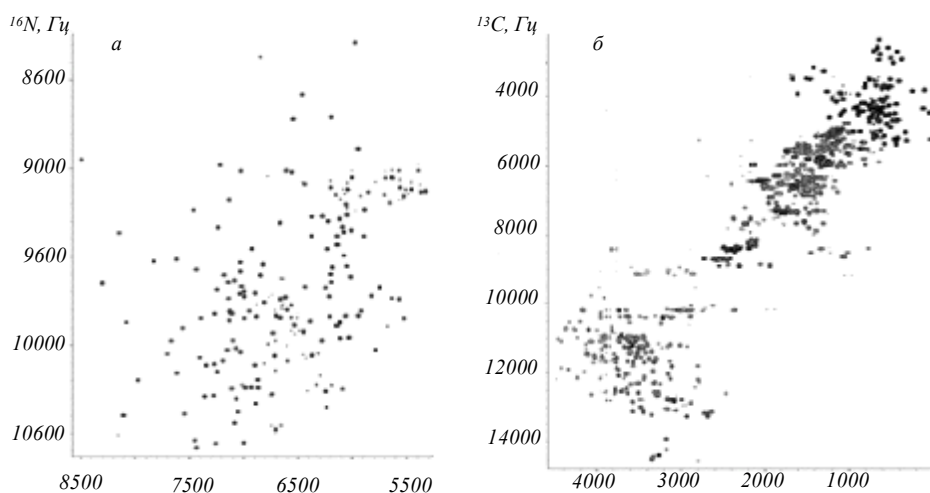


Рис. 4. Двомірні ЯМР спектри рекомбінантного білка ЕМАР ІІ у розчині, записані на частоті 800 МГц на ЯМР-спектрометрі Varian VNMRS 800, концентрація білка становить 0,7 мМ: а – спектр $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC ЕМАР ІІ, який реєструє сигнали амідних груп поліпептидного остова білка; б – спектр $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HSQC ЕМАР ІІ, що реєструє сигнали бічних груп амінокислотних залишків білка

мас-спектрометрії, для зразків ЕМАР ІІ та теоретично розрахованих за допомогою веб-сервера Isotopident (http://education.expsy.org/student_projects/isotopident/htdocs/). Показано, що включення ізотопів $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ у препарати білків становить більше 95 %. Це повністю відповідає вимогам до методів ЯМР-спектроскопії.

Отримано двомірні $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ і $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQC ЯМР-спектри препаратів білка ЕМАР ІІ, мічених обома ізотопами ^{13}C та ^{15}N , у натрій-фосфатному буфері, рН 8,0 (рис. 4). Аналіз одержаних спектрів виявив значну дисперсію сигналів як у спектрі $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC для сигналів амідних груп поліпептидного остова білка, так і в спектрі $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HSQC для сигналів бічних груп амінокислотних залишків білка. Отримані дані ЯМР підтверджують наявність тривимірної структури білка у водному розчині.

Варто зазначити, що спектри ЯМР ЕМАР ІІ залишаються практично незмінними при їхній реєстрації протягом 5–6 днів, що вказує на стабільність ізотопно мічених препаратів білка. Це в принципі дає можливість для подальшого віднесення сигналів до окремих груп у структурі поліпептидного ланцюга білка та наступної реконструкції тривимірної структури ЕМАР ІІ у водному розчині.

Автори висловлюють щире подяку д-ру М. Дадлесу (лабораторія мас-спектрометрії, Інститут біохімії і біофізики Польської Академії Наук) за допомогу у вимірюванні мас-спектрів препаратів білків. Дослідження частково підтримані грантом Польського Міністерства науки та вищої освіти (грант № 301 07131/2159) та грантом № 34/11 цільової

комплексної міждисциплінарної програми НАН України «Фундаментальні основи молекулярних і клітинних технологій». Доступ до ЯМР-спектрометра VNMRS 800 у Словенському центрі ЯМР в Національному Інституті хімії (м. Любляна, Словенія) надано в рамках європейського проекту «East-NMR FP7» (грант № 228461).

D. M. Lozhko, I. Yu. Zhukov¹, A. I. Kornelyuk

Bacterial expression and $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ isotopic labeling of EMA PII cytokine for structural studies by NMR spectroscopy

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

¹Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences
5a, Pawinskiego, 02-106 Warsaw, Poland

Summary

Aim. Bacterial expression and isotopic labeling of recombinant EMAP II in preparative scale with the aim to study its spatial structure by NMR spectroscopy. **Methods.** The recombinant ^{15}N , $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled EMAP II protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysE on M9 minimal medium and purified by metal-chelated chromatography on Ni-NTA agarose. Quality of obtained for NMR studies ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -double labeled EMAP II was confirmed by mass spectroscopy and used for preparation of NMR samples. **Results.** The preparations of ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ double labelled EMAP II were obtained. The recorded NMR spectra of EMAP II were analyzed. **Conclusions.** Dispersion of NMR signals in two-dimensional $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra confirm the presence of compact three-dimensional structure of the protein. The NMR samples were stable at least for 5–6 days at chosen conditions. These results will be used as a starting point for determination of high resolution three-dimensional structure of recombinant EMAP II cytokine in solution by NMR spectroscopy.

Keywords: cytokine, EMAP II, isotopic labeling, mass spectroscopy, NMR spectroscopy, two-dimensional spectra.

Д. Н. Ложко, И. Ю. Жуков, А. И. Корнелюк

Бактериальная экспрессия и мечение изотопами $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ цитокина ЕМАР II для структурных исследований методом ЯМР-спектроскопии

Резюме

Цель. Получение рекомбинантного цитокина ЕМАР II в препаративных количествах с использованием бактериальной экспрессии и его изотопное мечение для исследования пространственной структуры методами мультимерной ЯМР-спектроскопии. **Методы.** ЕМАР II экспрессирован в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysE на минимальной среде с мечением изотопами ^{13}C и ^{15}N , а также очищен методом металл-хелатирующей хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Для проверки массы и чистоты меченых рекомбинантных белков применен метод масс-спектрометрии. Получены двухмерные ЯМР-спектры рекомбинантного цитокина ЕМАР II в растворе. **Результаты.** Выделены препараты рекомбинантного белка ЕМАР II, меченные изотопами ^{13}C и ^{15}N , которые исследовали методом двухмерной ЯМР-спектроскопии. **Выводы.** Дисперсия сигналов ЯМР в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ и $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -HSQC подтверждает наличие компактной трехмерной структуры белка. Изотопно меченные препараты ЕМАР II сохраняют стабильность на протяжении 5–6 дней, что дает возможность дальнейшего определения пространственной структуры белка в растворе методом ЯМР-спектроскопии.

Ключевые слова: цитокин, ЕМАР II, изотопное мечение, масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, двухмерные спектры.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactors of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // *Exp. Oncol.*—2004.—**26**, N 4.—P. 250–255.
2. Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y. G., Godman G., Familletti P. C., Wang F., Pan Y. C. et al. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumour-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // *J. Biol. Chem.*—1992.—**267**, N 28.—P. 20239–20247.
3. Schwarz M. A., Kandel J., Brett J., Li J., Hayward J., Schwarz R. E., Chappay O., Wautier J. L., Chabot J., Lo Gerfo P. L., Stern D. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells // *J. Exp. Med.*—1999.—**190**, N 3.—P. 341–354.
4. Schwarz R. E., Schwarz M. A. In vivo therapy of local tumour progression by targeting vascular endothelium with EMAP-II // *J. Surg. Res.*—2004.—**120**, N 1.—P. 64–72.
5. Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I., Kornelyuk A. I. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model // *Exp. Oncol.*—2007.—**29**, N 4.—P. 267–271.
6. Shalak V., Kaminska M., Mitnacht-Kraus R., Vandenabeele P., Clauss M., Mirande M. The EMAP II cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAP II component // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 26.—P. 23769–23776.
7. Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dubrovsky A. L., Murray J. C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Biopolym. Cell.*—1999.—**15**, N 2.—P. 168–172.
8. Wang C. C., Schimmel P. Species barrier to RNA recognition overcome with nonspecific RNA binding domains // *J. Biol. Chem.*—1999.—**274**, N 23.—P. 16508–16512.
9. Kordysh M. A., Kornelyuk A. I. Fluorescence and dynamics of structural environment of Trp125 fluorophore in EMAP II cytokine // *Visnyk of V. N. Karazin Kharkiv National University. Biophys. Bull.*—2003.—**2**, N 13.—P. 86–90.
10. Kordysh M. A., Dubrovsky O. L., Kornelyuk A. I. Local conformational transition of Trp125 in EMAP II cytokine induced by physiological temperature // *Physics of the Alive.*—2005.—**13**, N 1.—P. 79–85.
11. Renault L., Kerjan P., Pasqualato S., Menetrey J., Robinson J. C., Kawaguchi S., Vassilyev D. G., Yokoyama S., Mirande M., Cherrif J. Structure of the EMAP II domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry // *EMBO J.*—2001.—**20**, N 3.—P. 570–578.
12. Guntert P. Structural calculations of biological macromolecules from NMR data // *Q. Rev. Biophys.*—1998.—**31**, N 2.—P. 145–237.
13. Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—**72**.—P. 248–254.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—**227**, N 5259.—P. 680–685.
15. Dubrovsky A. L., Brown Jr., Kornelyuk A. I., Murray J. C., Matsuka G. Kh. Bacterial expression of full-length and truncated forms of cytokine EMAP-2 and cytokine-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Biopolym. Cell.*—2000.—**16**, N 3.—P. 229–235.
16. Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G. W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // *J. Biomol. NMR.*—1995.—**6**, N 3.—P. 277–293.
17. Goddard T. D., Kneller D. G. SPARKY 3.—San Francisco: Univ. of California, 2008.

UDC 577.217:577.322

Received 22.04.11