

УДК 577.322

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ И ДИНАМИКА СТРУКТУРНОГО ОКРУЖЕНИЯ ФЛУОРОФОРА TRP125 В ЦИТОКИНЕ ЕМАР II

М.А. Кордыш, А.И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Поступила в редакцию 16 ноября 2003

Цитокин ЕМАР II - мультифункциональный белок, обладающий как цитокиновой, так и тРНК-связывающей активностями. Методом флуоресцентной спектроскопии изучена внутримолекулярная динамика цитокина ЕМАР II в растворе. Спектр триптофановой флуоресценции цитокина ЕМАР II обусловлен эмиссией остатка Trp125 в белке. На основании данных флуоресцентной спектроскопии и компьютерного моделирования охарактеризовано микроокружение остатка триптофана и степень доступности поверхности Trp125 молекулам растворителя, которая составляет около 10%. Быстрая конформационная подвижность в цитокине ЕМАР II обнаружена с помощью тушения флуоресценции флуорофора Trp125 нейтральным тушителем акриламидом вследствие флуктуаций структуры белка в наносекундном временном интервале.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитокин ЕМАР II, динамика белков, флуоресценция

Цитокин ЕМАР II (endothelial monocyte-activating polypeptide II) является мультифункциональным полипептидом, обладающим как цитокиновой, так и тРНК-связывающей активностями. Этот новый цитокин впервые обнаружен как фактор, усиливающий прокоагуляционную активность эндотелиальных клеток человека [1]. У моноцитов и лейкоцитов ЕМАР II вызывает положительный хемотаксис. ЕМАР II обладает антиопухолевой активностью [2, 3, 4] и способен вызывать апоптоз в культуре клеток [5]. Предшественником ЕМАР II цитокина является белок proЕМАР II, идентичный полипептиду р43 - компоненту высокомолекулярного комплекса аминоксил-тРНК синтетаз (АРСаз) у высших эукариот [6]. Данный комплекс состоит из девяти АРСаз (GluPC, ProPC, IlePC, LeuPC, MetPC, GlnPC, ArgPC, LysPC и AspPC), которые ассоциированы с тремя вспомогательными белками (р43, р38 и р18) в сложный мультибелковый ассоциат [7]. В этом комплексе р43 принимает участие в белок-белковом взаимодействии с р38, ArgPC и GlnPC. Наличие ассоциации proЕМАР II с разными АРСазами свидетельствует о том, что он принимает участие в процессе белкового синтеза.

Цитокин ЕМАР II обнаруживает высокую степень гомологии аминокислотной последовательности (52,7%) с некаталитическим С-модулем тирозил-тРНК синтетазы высших эукариот [8]. Установлено, что изолированный С-модуль тирозил-тРНК синтетазы также проявляет ЕМАР II-подобную цитокиновую активность: индуцирует рост хемотаксиса моноцитов и увеличивает уровень экспрессии тканевого фактора эндотелиальных клеток человека [9].

Однако основная функция ЕМАР II-подобных доменов в белке р43 и тирозил-тРНК синтетазе состоит в специфическом связывании тРНК, причем этот процесс определяется наличием пространственной структуры тРНК, ее стабильной L-формы [10, 11]. Процесс образования комплекса тРНК и ЕМАР II сопровождается взаимной конформационной адаптацией, однако природа этих конформационных изменений остается практически неизученной. Возможно, что реализация двух различных функций ЕМАР II (РНК-связывающей и цитокиновой) происходит в разных конформациях белка, однако данная гипотеза не подтверждена экспериментально.

В настоящее время одним из наиболее чувствительных и информативных методов исследований конформационных изменений белков в растворе является флуоресцентная спектроскопия [12,13]. Следует отметить, что цитокин ЕМАР II является одотриптофановым белком. ЕМАР II содержит остаток Trp125, который представляет собой природный флуоресцентный зонд в структуре данного белка [14]. Известно, что флуоресценция триптофановых остатков в белках очень чувствительна к структурным изменениям, происходящим в локальном окружении этих флуорофоров [12]. Такие изменения могут отображаться в параметрах спектров флуоресценции и нести информацию о конформационной динамике белка в растворе. В связи с этим, в данной работе проведены исследования структурного окружения Trp125 в цитокине ЕМАР II, экспонированности Trp125 в белковой глобуле и динамики микроокружения флуорофора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся белок цитокин ЕМАР II человека с молекулярным весом 19 кДа, полученный нами ранее согласно [14]. Данный белок имеет следующую первичную структуру:

1	SKPIDVSRDL	LRIGCIITAR	KHPDADSLYV	EEVDVGEIAP	RTVVSGLVNH	VPLEQMQRNM
61	VILLCNLKPA	KMRGVLSQAM	VMCASSPEKI	EILAPPNGSV	PGDRITFADF	PGEPDKELNP
121	KKKIWEQIQP	DLHTNDECVA	TYKGVPFVEVK	GKGVCRQATM	SNSGIK	

Белок был экспрессирован в клетках *E.coli* и очищен до гомогенного состояния (не менее 95%) металхелатирующей хроматографией на Ni-NTA агарозе согласно [14]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм с учетом длины оптического пути и коэффициента экстинкции белка ($E_{280}^M = 8490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Спектры поглощения исследуемого белка записывали на двухканальном спектрофотометре "Specord UV VIS" (Германия).

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре "Model 850" ("Hitachi", Япония). Спектральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и регистрации составляла 5 нм. Длина волны возбуждающего света составляла 296 нм. Точность определения длины волны $\pm 0,1$ нм. Спектры флуоресценции записывали в интервале длин волн 300 - 400 нм со скоростью сканирования 30 - 60 нм/мин. Измерение спектров флуоресценции ЕМАР II проводили в буфере 20 мМ трис-НСl, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl_2 , рН 7.5, с термостатированием при температуре 25°C с точностью $\pm 0,2$ °C.

Опыты по тушению флуоресценции ЕМАР II проводили путем титрования белка CsCl или акриламидом, записывая спектры флуоресценции ЕМАР II в присутствии тушителей и измеряя интенсивности белковой флуоресценции в максимуме спектра излучения. Измеренные значения интенсивностей флуоресценции белка корректировали на коэффициенты разбавления и экранирования [15] добавляемых в раствор реагентов. Эффективность тушения характеризовали отношением максимального изменения интенсивности флуоресценции $\Delta I_H = I_0 - I_H$ к исходной интенсивности излучения белка I_0 . Полученные результаты по тушению флуоресценции белка были представлены в координатах Штерна-Фольмера [12].

Визуализацию и компьютерный анализ микроокружения остатка Trp125 в белке проводили с помощью программы SwissPDB-Viewer 3.7(b2), используя данные рентгеноструктурного анализа для белка ЕМАР II [16, 17]. Для изучения окружения флуорофора Trp125 была выбрана кристаллографическая форма ЕМАР II 1euj(A), в координатном файле которой были удалены молекулы воды. Расчет степени доступности поверхности остатка Trp125 для молекул растворителя проводили с помощью функции Select/Accessible aa... Расстояния до соседних остатков определяли с помощью функции Select/Neighbors of selected aa... - от 1 Å до 12 Å с шагом 1 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр собственной флуоресценции ЕМАР II при длине волны возбуждения 296 нм (условие возбуждения только триптофановой флуоресценции белка) представлен на рис. 1. Поскольку в структуре ЕМАР II содержится только 1 остаток Trp125, флуоресценция белка обусловлена эмиссией этого флуорофора. Измеренное положение максимума спектра флуоресценции ЕМАР II составляет около 335 нм, а квантовый выход флуоресценции - 0,07, т.е. структурное состояние флуорофора Trp125 в исследуемом белке соответствует промежуточному состоянию между структурными классами I и II триптофанилов в белках согласно модели 3-х классов Бурштейна [18, 19].

Таким образом, данные флуоресцентной спектроскопии свидетельствуют о том, что остаток Trp125 не является полностью экранированным в белковой глобуле и частично экспонирован на поверхности белковой макромолекулы.

Нами проведен компьютерный анализ доступности Trp125 в кристаллографической структуре ЕМАР II (форма 1euj(A)), в координатном файле которой были удалены молекулы воды. С использованием программы SwissPDB-Viewer 3.7(b2) проведен расчет степени доступности поверхности остатка Trp125 к молекулам растворителя. Согласно полученным данным степень доступности остатка Trp125 составила около $10 \pm 1\%$, что согласуется с экспериментальными данными о состоянии Trp125 в белковой глобуле, полученными на основании анализа данных флуоресценции ЕМАР II.

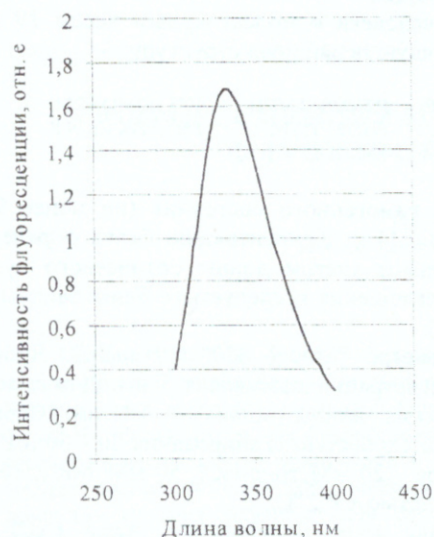


Рис. 1. Спектр флуоресценции ЕМАР II при длине волны возбуждения 296 нм.

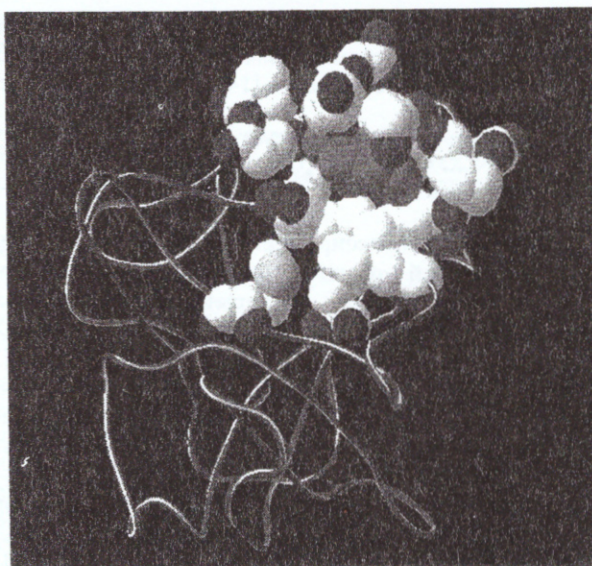


Рис. 2. Микроокружение остатка Trp125 в структуре ЕМАР II.

Визуализация окружения остатка Trp125 в ЕМАР II была проведена в сфере радиусом 5 Å, в центре которой находится Trp125 (рис. 2). В этой области локализованы 17 аминокислотных остатков, среди которых находятся как гидрофобные (Leu9, Leu64, Leu67, Met80, Met82, Leu118, Ile124, Trp125, Ile128, Pro130, Leu132, Ile165,) так и гидрофильные (Lys123, Glu126, Gln127, Gln129, Lys166) остатки. Определены расстояния от остатка Trp125 к ближайшим аминокислотным остаткам, природа которых может существенно влиять на характеристики флуоресценции белка [20]. Полученные данные представлены в таблице 1. Следует отметить среди ближайших к Trp125 наличие пяти заряженных остатков (Lys123, Lys166, Glu126, Gln127, Gln129), боковые цепи которых могут тушить флуоресценцию Trp125 путем передачи протона возбужденного состояния (Lys123, Lys166) или передачи электрона возбужденного состояния (Glu126, Gln127, Gln129) [21]. Анализируя расстояния, на которых находятся тушащие группы от Trp125 (таблица 1), можно сделать вывод о том, что основной вклад в тушение флуоресценции Trp125, по-видимому, вносят остатки Glu126, Gln127, Gln129, находящиеся на расстоянии 3,5; 7,26 и 4,93 Å от остатка триптофана, соответственно.

С целью изучения доступности остатка Trp125 в глобуле белка ЕМАР II нами проведены эксперименты по тушению собственной флуоресценции ЕМАР II внешними тушителями - нейтральным тушителем акриламидом и катионами Cs^+ . Определены максимальные изменения интенсивности излучения при тушении флуоресценции ЕМАР II акриламидом и Cs^+ , которые равны 54% и 11%, соответственно.

Полученные результаты по тушению флуоресценции ЕМАР II этими тушителями в координатах Штерна-Фольмера представлены на рис. 3. В случае тушения флуоресценции ЕМАР II катионами Cs^+ максимальное тушение составило около 11%. Известно, что заряженные ионы Cs^+ плохо проникают внутрь неполярного ядра белка, поэтому этот тушитель тушит флуоресценцию только экспонированных остатков триптофана. Величина тушения флуоресценции (11%) подтверждает частичную экспонированность остатка триптофана в белковой глобуле, что хорошо согласуется с данными по доступности Trp125, полученными с помощью методов компьютерного анализа для кристаллографической структуры ЕМАР II ($10 \pm 1\%$).

Для нейтрального тушителя акриламида величина тушения флуоресценции Trp125 в ЕМАР II существенно больше и составляет около 54%. Известно, что акриламид тушит предпочтительно экспонированные остатки триптофана, но вместе с этим может проникать внутрь белковой матрицы [12,18,19]. Линейный характер графика Штерна-Фольмера для тушения акриламидом (рис. 3) согласуется с динамическим характером тушения триптофановой флуоресценции [12], которое определяется частотой столкновений между флуорофором и тушителем. В статической структуре белка аминокислотные остатки плотно упакованы, однако свободное пространство для проникновения молекул типа акриламида внутрь

белка может появляться в результате динамических флуктуаций конформации белка и появления локальных полостей.

Аминокислота, к которой измерялось расстояние от Trp144	Атом в аминокислотном остатке, к которому измерялось расстояние от C ^{δ1} -атома Trp125	Расстояние, Å
Leu9	C ^γ	5,84
Leu64	C ^γ	5,43
Leu67	C ^γ	5,75
Met80	S ^δ	5,75
Met82	S ^δ	6,42
Leu118	C ^γ	7,29
Lys123	C ^δ	10,75
Ile124	C ^{γ1}	8,97
Glu126	C ^δ	3,50
Gln127	C ^δ	7,26
Ile128	C ^{γ1}	8,97
Gln129	C ^δ	4,93
Pro130	C ^α	7,26
Leu132	C ^γ	9,22
Ile165	C ^{γ1}	10,70
Lys166	C ^δ	8,79

Таблица 1. Расстояние от Trp125 к ближайшим аминокислотным остаткам.

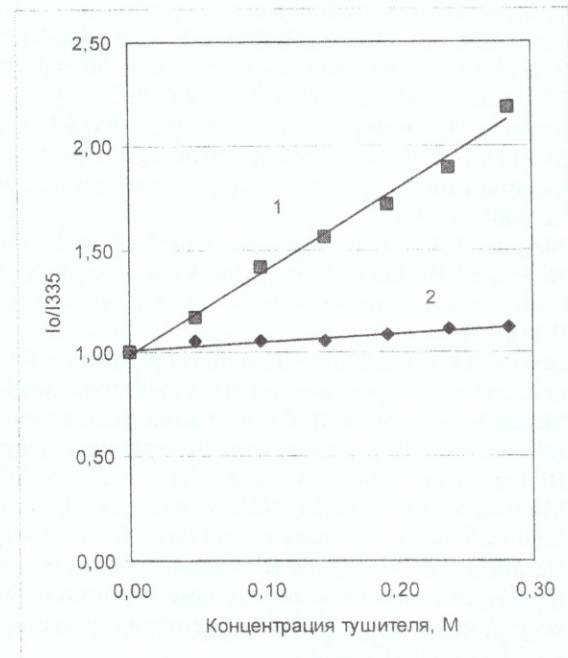


Рис. 3. Тушение флуоресценции ЕМАР II нейтральным тушителем акриламидом (1) и полярным тушителем Cs⁺ (2) в координатах Штерна-Фольмера. Концентрация ЕМАР II в растворе - $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, температура 25^oС.

Таким образом, для объяснения высокой эффективности тушения флуоресценции Trp125 акриламидом в глобуле белка ЕМАР II следует допустить наличие диффузии тушителя внутрь белковой матрицы, которая происходит вследствие конформационной подвижности белка - флуктуаций его пространственной структуры в наносекундном временном диапазоне. Быстрая конформационная подвижность приводит к формированию локальных полостей в структуре белка, что обеспечивает диффузию нейтральных молекул акриламида внутрь белковой глобулы и значительно более высокую эффективность тушения флуоресценции Trp125 в ЕМАР II.

ВЫВОДЫ

На основе анализа данных собственной флуоресценции белка ЕМАР II, тушения его флуоресценции внешними тушителями, а также результатов компьютерного анализа кристаллографической структуры, можно сделать вывод о том, что флуорофор Trp125 в значительной степени экранирован в структуре исследуемого цитокина. Обнаружено, что доступность Trp125 в белке может возрастать вследствие наличия быстрой конформационной подвижности белковой матрицы в наносекундном временном интервале. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существовании значительной конформационной подвижности белка ЕМАР II в растворе, а Trp125 может использоваться как природный флуоресцентный зонд в структуре белка для мониторинга локальных конформационных изменений. Такие конформационные изменения могут иметь существенное значение при взаимной конформационной адаптации белка и тРНК в процессе образования их специфического комплекса.

Благодарность. Авторы выражают благодарность А.Л.Дубровскому за выделение препарата ЕМАР II. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 5.07/200 Государственного фонда фундаментальных исследований Министерства образования и науки Украины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. Endothelia-monocyte activating polypeptide II. // *J. Biol. Chem.* - 1992. - Vol.267, N28. - P. 20239-20247.
2. Kao J, Houck K, Fan Y, Haehnel I, Libutti S.K., Kayton M.L., Grikscheit T, Chabot J, Nowygrod R, Greenberg S, et al. Characterization of a novel tumor-derived cytokine Endothelia-monocyte activating polypeptide II. // *J. Biol. Chem.* - 1994. - Vol.269. - P. 25106-25119.
3. Schwarz MA, Kandel J, Brett J, Li J, Hayward J, Schwarz RE, Chappey O, Wautier JL, Chabot J, Lo Gerfo P, Stern D. Endothelia-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cell. // *J. Exp. Med.* - 1999. Vol. 190, N3. - P.4066-4069.
4. Marvin M.R., Libutti S.K., Kayton M., Kao J., Hayward J., Grikscheit T., Fan Y., Brett J., Weinberg A., Nowygrod R., LoGerfo P., Feind C., Hansen K.S., Schwartz M., Stern D., Chabot J. A novel tumor-derived mediator that sensitizes cytokine-resistant tumors to tumor necrosis factor. // *J. Surg. Res.* - 1996. Vol.24. - P.248-255.
5. Berger A.C., Tang G., Alexander H.R., Libutti S.K. Endothelia-monocyte activating polypeptide II induces endothelial cell apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis // *Microvasc. Res.* -2000. Vol.60, N1. - P.70-80.
6. Shalak V., Kaminska M., Mitnaht-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. - Vol.276, N26. - P. 23769-23776.
7. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* - 1991. - Vol.40. - P.95-142.
8. Леванец О.В., Найденев В.Г., Одынец К.А., Вудмаска М.И., Мацука Г.Х., Корнелюк А.И. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-ТРНК синтетазы млекопитающих с цитокином EMAP II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-ТРНК синтетаз // *Биополимеры и клетка.* - 1997. - Т.13, N6. - С. 474-478.
9. Kornelyuk A, Maarten P., Dubrovsky A., Murray J. Cytokine activity of non-catalytic EMAP II-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Biopolimery i kletka.* - 1999. - Vol.15, N2. - P.168-172.
10. Chihade V., Schimmel P. Assembly of a catalytic unit for RNA microhelix aminoacylation using nonspecific RNA binding domains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1999. - Vol. 96. - P.12316-12321.
11. Wang C.C., Schimmel P. Species barrier to RNA recognition overcome with nonspecific RNA binding domains // *J. Biol. Chem.* - 1999. - Vol.274. - P. 16508-16512.
12. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescent Spectroscopy. - New York: Plenum Press, 1999.
13. Ladokhin A.S. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis // *Encyclopedia of Analytical Chemistry* - Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000.
14. Дубровский А. Л., Браун Дж., Корнелюк А. И., Мюррей К., Мацука Г. Х.. Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина EMAP II и цитокинподобного домена тирозил-ТРНК синтетазы млекопитающих // *Биополимеры и клетка.* - 2000. - Т.16, N3 - С. 229-235.
15. Ehrenberg M., Cronvall E., Rigler R. Fluorescence of proteins interacting with nucleic acids: Correction for light absorption // *FEBS Lett.* - 1971. - Vol. 18, N2. - P. 199-203.
16. Renault L., Kerjan P., Pasqualato S., Menetrey J., Robinson J. C., Kawaguchi S., Vassylyev D.G., Yokoyama S., Mirande M., Cherfils J. Structure of the EMAP II domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry // *EMBO J.* - 2001. - Vol. 20, N3. - P. 570-578.
17. Kim Y., Shin J., Li R., Cheong C., Kim K., Kim S. A novel anti-tumor cytokine contains a RNA-binding motif present in aminoacyl-tRNA synthetases // *J. Biol. Chem.* -2000.-275.-P.27062-27068.
18. Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белка. Природа и применение // *Итоги науки и техники. Биофизика.* - 1977. - Т.7. - С.189-195.
19. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // *Photochem. Photobiol.* - 1973. - V.18, №2 - P.263-279.
20. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия: В 3-х т. Пер. с англ. Москва: Мир, 1984. - Т.1 - 336 с.
21. Chen Y., Barkley M.D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins // *Biochemistry* // 1998. - Vol.37, N28. - P. 9976 - 9982.