



УДК 577.152.611*4.042 : 577.112.4

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ТРИПТОФАНОВЫХ ОСТАТКОВ ЛЕЙЦИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ N-БРОМСУКЦИНИМИДОМ И 2-ОКСИ-5-НИТРОБЕНЗИЛБРОМИДОМ

*Корнелюк А. И., Шилин В. В., Гудзера О. И.,
Рожко О. Т., Мацука Г. Х.*

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

С помощью специфических химических реагентов, N-бромсукцинимид и 2-окси-5-нитробензилбромид, изучена доступность для модификации триптофановых остатков в лейцил-ТРНК-синтетазе из молочной железы коров. Для регистрации хода модификации использовали УФ-поглощение и собственную флуоресценцию триптофановых остатков фермента. Показано, что в нативных условиях (рН 7, 8) модификации подвергаются два поверхностных остатка в каждой субъединице димерного фермента. В денатурирующих условиях (6 М хлоргидрат гуанидина) модифицируются также и внутренние триптофановые остатки. При модификации остатков триптофана происходит инактивация лейцил-ТРНК-синтетазы как в реакции аминоацилирования, так и в реакции АТР-РР₁-обмена. В специфическом комплексе лейцил-ТРНК-синтетазы с тРНК^{Leu} один из поверхностных остатков триптофана экранирован и не подвергается модификации использованными реагентами.

Лейцил-ТРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.4), выделенная из лактирующей молочной железы коров, представляет собой структурный и функциональный димер, состоящий из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой ~80 кДа [1]. Анализ параметров триптофановой флуоресценции лейцил-ТРНК-синтетазы [2, 3], проведенный нами ранее в рамках модели дискретных классов триптофановых остатков в белках, разработанной Бурштейном [4, 5], показал, что в каждой субъединице синтетазы два остатка триптофана локализованы на поверхности белка, а остальные пять расположены внутри белка и недоступны для действия таких ионных тушителей флуоресценции, как Cs⁺ и I⁻. С помощью метода тушения флуоресценции синтетазы внешними ионами также показано [2], что в специфическом комплексе синтетазы с тРНК^{Leu} один из поверхностных триптофановых остатков расположен в области контакта синтетазы с тРНК.

Изучение расположения остатков триптофана в белковой глобуле представляет существенный интерес, так как они могут участвовать в формировании центров связывания субстратов аминоксил-ТРНК-синтетаз, в частности тРНК. В то же время остатки триптофана белков являются собственными зондами, УФ-флуоресценция которых исключительно чувствительна к локальному структурному окружению и изменению третичной структуры молекулы фермента [4, 5].

В данной работе для изучения структурного состояния триптофановых остатков в лейцил-ТРНК-синтетазе и ее комплексах с субстратами использован метод специфической химической модификации N-бромсукцинимидом и 2-окси-5-нитробензилбромидом.

N-Бромсукцинимид — реагент, широко используемый для модификации остатков триптофана в белках [6—14]. Окисление триптофановых остатков N-бромсукцинимидом сопровождается уменьшением оптического поглощения при 280 нм [15], что позволяет определить количество модифицированных остатков. Однако специфичность модификации остатков триптофана N-бромсукцинимидом необходимо контролировать, особенно при больших избытках реагента, когда возможны побочные реакции модификации других групп в белке.

Модификацию лейцил-ТРНК-синтетазы N-бромсукцинимидом проводили в 0,01 М трис-HCl-буфере при рН 7,8 в условиях, оптимальных для ами-

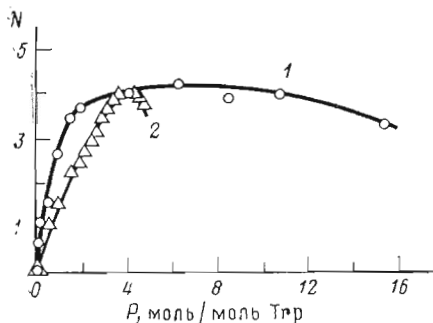


Рис. 1

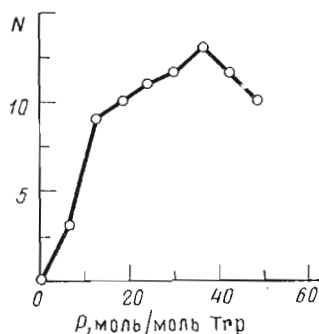


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость количества модифицированных N-бромсукцинимидом триптофановых остатков (N) в лейцил-тРНК-синтетазе (1) и лизозиме (2) от количества реагента в растворе (P , моль/моль Trp)

Рис. 2. Модификация триптофановых остатков лейцил-тРНК-синтетазы N-бромсукцинимидом в денатурирующих условиях в 6 М хлоргидрате гуанидина

ноацелирования тРНК^{Leu} лейцил-тРНК-синтетазой [1]. Последовательное увеличение содержания N-бромсукцинимида в растворе вызывало уменьшение оптического поглощения белка при 280 нм в результате модификации триптофановых остатков.

Как можно видеть из рис. 1, зависимость количества модифицированных остатков триптофана от избытка реагента (P) имеет приблизительно линейный характер вплоть до величины $P=2$ моль/моль Trp, а при $P=6$ моль/моль Trp количество модифицированных остатков триптофана достигает максимальной величины. Существенно, что белок, модифицированный реагентом при $P \leq 6$ моль/моль Trp, сохраняет в спектрах поглощения изобестическую точку при 295 нм. Это свидетельствует о сохранности нативной конформации белка, статистическом характере модификации триптофановых остатков и, следовательно, о сходстве состояний модифицируемых остатков и остатков триптофана в растворе.

Условия проведения реакции (рН 7, 8) не являются оптимальными для модификации триптофана [6, 15], однако использование требуемых кислых значений рН в нашем случае невозможно, так как при понижении рН до 6 наблюдается резкое падение ферментативной активности, а при рН 5 — осаждение белка из раствора.

Учитывая вероятное понижение эффективности окисления триптофана N-бромсукцинимидом при рН 7, 8, а также возможность неспецифического характера модификации белка этим реагентом, мы контролировали в данной работе сохранность в условиях эксперимента остатков тирозина, фенольная группа которого также может быть затронута модификатором [15]. Для этого мы определяли количество тирозина в лейцил-тРНК-синтетазе до модификации, а также после модификации N-бромсукцинимидом в условиях сохранения изобестической точки в спектрах поглощения и при больших избытках реагента, используя метод [16]. Оказалось, что при малых количествах реагента ($P \leq 6$ моль/моль Trp) количество тирозина составляет 22 ± 2 остатка на 1 моль белка (димер), что практически совпадает с содержанием триптофана в немодифицированной синтетазе. В то же время при больших избытках N-бромсукцинимида ($P=36$ моль/моль Trp), когда изобестическая точка в спектре поглощения больше не сохраняется, число тирозиновых остатков в синтетазе составило $14,4 \pm 2$ на 1 моль белка, т. е. остатки тирозина подвергаются модификации N-бромсукцинимидом лишь при больших избытках реагента.

Количество остатков триптофана в лейцил-тРНК-синтетазе, модифицируемых N-бромсукцинимидом при $P=6$ (рис. 1), когда изобестическая точка сохраняется, оказалось равным $4,21 \pm 0,2$ остатка на димер фермента. Соответственно в субъединице симметричного димерного фермента доступ-

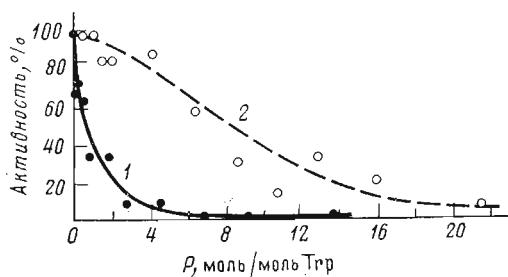


Рис. 3

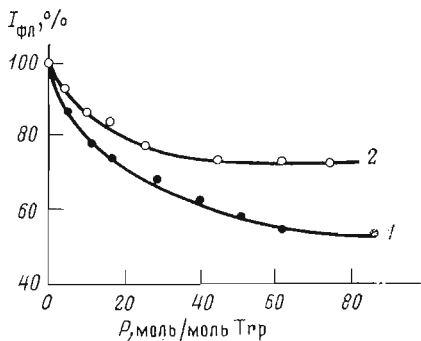


Рис. 4.

Рис. 3. Зависимость ферментативной активности лейцил-тРНК-синтазы в реакции аминокцилирования (1) и АТФ- ^{32}P пирофосфатного обмена (2) от степени модификации белка N-бромсукцинимидом

Рис. 4. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{Фл}}$ 340 нм, $\lambda_{\text{возб}}$ 296 нм) лейцил-тРНК-синтазы (1) и комплекса лейцил-тРНК-синтазы с тРНК^{Leu} (2) от степени модификации триптофановых остатков

ными оказываются около двух триптофановых остатков, что совпадает с данными флуоресцентного анализа, полученными нами ранее [2, 3].

Параллельно в качестве контроля проводили модификацию N-бромсукцинимидом лизоцима при pH 7,8. В лизоциме количество остатков триптофана, доступных для модификации в этих условиях (рис. 1, 2), при $P=4$ моль/моль Trp составляет $3,98 \pm 0,10$, что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа для лизоцима [17].

Модификация остатков триптофана лейцил-тРНК-синтазы N-бромсукцинимидом была проведена также в денатурирующих условиях в 6 M хлоргидрате гуанидина (рис. 2). Количество триптофана, модифицируемого в этих условиях, составляет $13,1 \pm 0,5$ остатка на димер фермента, что близко к общему содержанию триптофановых остатков в лейцил-тРНК-синтазе (14 остатков на димер фермента), определенному нами ранее [3].

При изучении влияния модификации триптофановых остатков на ферментативную активность было установлено, что модификация N-бромсукцинимидом приводит к инактивации лейцил-тРНК-синтазы как в реакции аминокцилирования, так и в реакции АТФ-пирофосфатного обмена (рис. 3). Однако скорость инактивации фермента N-бромсукцинимидом в реакции аминокцилирования выше, чем в реакции АТФ-пирофосфатного обмена: инактивация синтазы в реакции аминокцилирования на 82% наступает при соотношении реагент — триптофан $P=2,5$ моль/моль, тогда как в реакции АТФ-пирофосфатного обмена аналогичный уровень инактивации наступает только при $P \sim 10-12$ моль/моль Trp.

Независимо процесс модификации остатков триптофана N-бромсукцинимидом изучали с помощью люминесцентной спектроскопии. Для свободного триптофана в растворе модификация N-бромсукцинимидом, в результате которой триптофан превращается в производное оксиндола, приводит к полному исчезновению собственной УФ-флуоресценции с $\lambda_{\text{возб}}$ 296 нм. Поэтому метод модификации белка этим реагентом с регистрацией флуоресценции может быть использован для анализа доступности остатков триптофана в белках. При модификации лейцил-тРНК-синтазы N-бромсукцинимидом максимальное тушение флуоресценции составляет 48% (рис. 4). Эта величина хорошо коррелирует с суммарным вкладом четырех поверхностных остатков триптофана в квантовый выход флуоресценции, определенный нами ранее (45% [2, 3]). При модификации комплекса лейцил-тРНК-синтазы с тРНК^{Leu} N-бромсукцинимидом (рис. 4, 2) эффект тушения флуоресценции снижается на 20% и максимальное тушение в этом случае составляет только 25%, что свидетельствует о защите прибли-

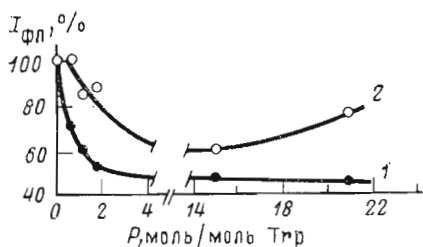


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции лейцил-тРНК-синтетазы (1) и комплекса лейцил-тРНК-синтетазы с тРНК^{Leu} (2) при модификации остатков триптофана 2-окси-5-нитробензилбромидом

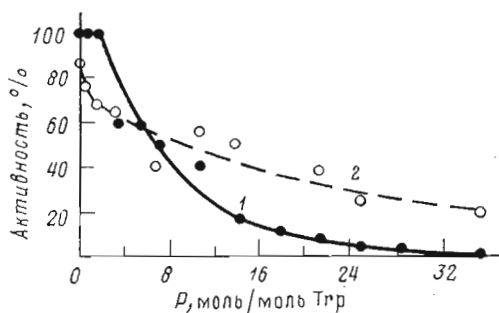


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость ферментативной активности лейцил-тРНК-синтетазы в реакции аминокцилирования АТР-PP₁-обмена при модификации фермента 2-окси-5-нитробензилбромидом

зительно половины экспонированных остатков триптофана от действия реагента.

Модификация лейцил-тРНК-синтетазы 2-окси-5-нитробензилбромидом. Условия модификации фермента 2-окси-5-нитробензилбромидом также были выбраны оптимальными для реакции аминокцилирования тРНК^{Leu} лейцил-тРНК-синтетазой. Ход модификации триптофановых остатков регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции белка. В модельных опытах модификация свободного триптофана 2-окси-5-нитробензилбромидом приводит к полному тушению флуоресценции. Как можно видеть из рис. 5 (кривая 1), максимальный уровень модификации лейцил-тРНК-синтетазы достигается уже при малых избытках реагента ($P \sim 2$ моль/моль Trp), что свидетельствует о высокой его селективности. Максимальный уровень модификации соответствует тушению триптофановой флуоресценции синтетазы на 52–53%. В присутствии специфической тРНК^{Leu} наблюдается эффект защиты остатков триптофана синтетазы от модификации 2-окси-5-нитробензилбромидом (рис. 5, 2). В этом случае величина модификации при больших избытках реагента соответствует тушению флуоресценции на 30–40%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что формирование специфического комплекса синтетазы с тРНК^{Leu} приводит к частичной защите экспонированных на поверхности фермента остатков триптофана от действия специфических реагентов. Следует, однако, иметь в виду, что взаимодействие с субстратом, особенно таким макромолекулярным, как тРНК, может вызывать изменение конформации фермента и перераспределение экспонированных и экранированных аминокислотных остатков. Однако ранее нами было показано [2, 3], что образование комплекса лейцил-тРНК-синтетазы с тРНК^{Leu} сопровождается только изменением квантового выхода флуоресценции триптофановых остатков без существенного изменения положения максимума и полуширины спектра флуоресценции. Это говорит об отсутствии значительных конформационных изменений в окружении триптофановых остатков, могущих приводить к изменению полярности окружения. Следовательно, при образовании комплекса синтетазы со специфической тРНК^{Leu} распределение остатков триптофана между различными классами существенно не изменяется.

Модификация лейцил-тРНК-синтетазы 2-окси-5-нитробензилбромидом приводит к инактивации фермента как в реакции аминокцилирования, так и в реакции АТР-PP₁-обмена (рис. 6, 1, 2).

Изучение структурного состояния триптофановых остатков в лейцил-тРНК-синтетазе с помощью химических модификаций N-бромсукцинимидом и 2-окси-5-нитробензилбромидом показывает, таким образом, что че-

четыре остатка триптофана локализованы на поверхности димера фермента, тогда как остальные 10 расположены внутри белковой глобулы и недоступны для действия модифицирующих реагентов. Селективность модификации триптофановых остатков достигается при небольших избытках реагента, когда в спектрах поглощения сохраняется изобестическая точка. Внутренние триптофановые остатки, экранированные в нативной структуре фермента, модифицируются только в денатурирующих условиях. Наблюдаемый различный характер влияния модификации триптофановых остатков на активность лейцил-тРНК-синтетазы в реакции аминокислотирования и АТР-РР-обмена может быть обусловлен тем, что в эти реакции вовлекаются разные остатки триптофана, имеющие различную экспонированность на поверхности фермента и соответственно различные скорости модификации.

В составе специфического комплекса лейцил-тРНК-синтетазы с тРНК^{Leu} поверхностные триптофановые остатки оказываются частично защищенными от действия модифицирующих реагентов. Можно предполагать, что эти экспонированные остатки триптофана локализованы в области контакта между синтетазой и тРНК^{Leu} (вероятно, только один из двух поверхностных остатков в каждой субъединице). Подобный вывод получен нами ранее [2] при изучении доступности триптофановых остатков лейцил-тРНК-синтетазы в свободном состоянии и в комплексе с тРНК^{Leu} для ионных тушителей флуоресценции — ионов Cs⁺. Защита остатков триптофана от модификации может быть обусловлена образованием комплекса с интеркаляцией индольного кольца триптофана между азотистыми основаниями тРНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали трис, дитиотреит, фенолметилсульфонилфторид, L-лейцин (Calbiochem, США), АТР, акриламид, N,N-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия, активированный уголь Norit (Serva, ФРГ), диэтиламиноэтилцеллюлозу DE-52, фильтры GF/C диаметром 2,4 см (Whatman, Англия), сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), пиррофосфат натрия (Merck, ФРГ). [¹⁴C]лейцин (уд. акт. 200 Ки/моль, Chemarol, СССР), [³²P]пиррофосфат натрия (уд. акт. 12 Ки/моль, Изотоп, СССР), N-бромсукцинимид, дважды перекристаллизованный, 2-окси-5-нитробензилбромид (Calbiochem, США), хлоргидрат гуанидина (Pierce, США). Обогащенную тРНК^{Leu} получали хроматографией в RPC-5-системе (препарат предоставлен М. А. Тукало, Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР).

Выделение лейцил-тРНК-синтетазы. Индивидуальную лейцил-тРНК-синтетазу выделяли из молочной железы коров согласно методу, описанному ранее [1]. В схему выделения лейцил-тРНК-синтетазы был введен новый этап хроматографии на сефарозе 4В с иммобилизованной рРНК. Для иммобилизации использовали фракцию рРНК молочной железы коров, содержащую смесь 18S и 28S рРНК в количестве 18 мг на 1 г сефарозы 4В. Использование данного этапа хроматографии при выделении позволило получить 160-кратное обогащение лейцил-тРНК-синтетазы по активности в реакции аминокислотирования тРНК. Гомогенность препарата фермента контролировали с помощью аналитического электрофореза в полиакриламидном геле по методу Дэвиса [18] и в денатурирующих условиях по методу Вебера — Осборна [19]. Чистота препаратов фермента составляла 90–95%.

Концентрацию фермента в растворе определяли спектрофотометрически, используя коэффициент поглощения $E_{280}^{1\text{ мг/мл}} = 0,83$ или коэффициент молярного поглощения $\epsilon_{280} = 1,424 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Величины коэффициентов были определены независимо весовым методом и теоретическим расчетом по известному аминокислотному составу.

Определение активности лейцил-тРНК-синтетазы. Стандартная инкубационная смесь для реакции аминокислотирования (0,1 мл) содержала 10 мкмоль трис-HCl-буфера (pH 7,8), 0,7 мкмоль АТР, 0,5 мкмоль MgCl₂,

100 мкг суммарной тРНК, 5 мкг фермента, 0,1 мкмоль [^{14}C]лейцина. Инкубацию проводили при 25° С в течение 5 мин. После осаждения белка 10% трихлоруксусной кислотой и промывания осадков на миллиметровых фильтрах его радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике Inter-technique SL-30.

Активность лейцил-тРНК-синтетазы в реакции АТФ-[^{32}P]пирофосфатного обмена определяли по методу [20]. Инкубационная смесь в объеме 0,2 мл содержала 0,08 мкмоль *L*-лейцина, 0,1 мкмоль АТФ, 0,2 мкмоль [^{32}P]пирофосфата натрия, 4 мкмоль MgCl_2 , 10 мкмоль трис-НСI-буфера, 5 мкг фермента. Инкубацию проводили 20 мин при 25° С, реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,2 М пирофосфата натрия в 5% трихлоруксусной кислоте и 0,2 мл 5% суспензии активированного угля. Смесь фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры. Осадок, сорбированный на фильтре, промывали водой, затем закрепляли 6,5% раствором поливинилового спирта. Радиоактивность фильтров после высушивания определяли на сцинтилляционном счетчике.

Модификацию белка *N*-бромсукцинимидом осуществляли в 0,01 М трис-НСI-буфере при рН 7,8. Использовали свежеприготовленный 0,01 М водный раствор *N*-бромсукцинимиды, предварительно дважды перекристаллизованного. Небольшие объемы (3–20 мкл) раствора *N*-бромсукцинимиды добавляли к 2 мл 2,3 мкМ раствора белка.

Реакционную смесь инкубировали в темноте при 20° С при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Окончание модификации устанавливали спектрофотометрически по прекращению уменьшения поглощения белка при 280 нм. Спектры поглощения в УФ-области записывали на спектрофотометрах Spesord UV VIS и Beckman-26. В качестве контроля параллельно проводили модификацию *N*-бромсукцинимидом свободного триптофана в растворе с концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ М. Количество модифицированных *N*-бромсукцинимидом триптофановых остатков определяли по следующему уравнению, предложенному в работе [15]:

$$N = 1,31 \Delta E_{280} E_{280}^{1 \text{ мг/мл}} \cdot M / 5500 \cdot E_{280}, \quad (1)$$

где E_{280} — начальное поглощение белка при 280 нм; ΔE_{280} — изменение поглощения при 280 нм при модификации; $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}}$ — коэффициент поглощения белка при 280 нм; M — молекулярная масса, для лейцил-тРНК-синтетазы равная 155 000; 1,31 — эмпирический коэффициент; 5500 — коэффициент молярного поглощения триптофана.

Модификацию триптофановых остатков *N*-бромсукцинимидом регистрировали также по уменьшению интенсивности триптофановой флуоресценции, возбуждаемой при 296 нм. Защитный эффект тРНК^{Leu} изучали в опытах по модификации триптофановых остатков с регистрацией флуоресценции. Для этого к образцу фермента с концентрацией 0,5 мкМ предварительно добавляли тРНК^{Leu} до конечной концентрации 7 мкМ, создавая необходимый избыток тРНК относительно фермента. Связывание тРНК^{Leu} с синтетазой и установление равновесия в комплексе регистрировали по кривой флуориметрического титрования с учетом экранирующего эффекта тРНК на длине волны возбуждения флуоресценции [2, 3].

Модификацию белка 2-окси-5-нитробензилбромидом проводили в 0,01 М трис-НСI-буфере при рН 7,8. Для модификации использовали 0,001 и 0,01 М растворы 2-окси-5-нитробензилбромида в сухом ацетоне. Небольшие объемы (3–5 мкл) раствора реагента добавляли к раствору белка (0,9 мкМ), создавая необходимый его избыток. Реакционную смесь инкубировали 10 мин в темноте при 20° С при постоянном перемешивании. Ход модификации остатков триптофана регистрировали по уменьшению интенсивности триптофановой флуоресценции, возбуждаемой при длине волны 296 нм. Измеренные интенсивности флуоресценции корректировали с учетом эффекта экранирования 2-окси-5-нитробензилбромидом при длине волны возбуждения и эффекта реабсорбции флуоресценции при длине волны эмис-

сия (340 нм), используя поправочный коэффициент W [5]:

$$W = \frac{1 - T_6}{1 - T_6 T_3 T_p} \cdot \frac{E_6 + E_3 + E_p}{E_6}, \quad (2)$$

где T_6 и E_6 — оптическое пропускание и поглощение белка при 296 нм; T_3 и E_3 — оптическое пропускание и поглощение после добавления 2-окси-5-нитробензилбромида при той же длине волны; T_p и E_p — оптическое пропускание и поглощение при 340 нм.

Концентрацию 2-окси-5-нитробензилбромида определяли, используя коэффициент молярного поглощения $\epsilon_{410} = 18450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [21]. Модификацию триптофановых остатков синтетазы в комплексе с тРНК^{Leu} регистрировали флуориметрически. Для образования комплекса к раствору синтетазы с концентрацией 0,9 мкМ добавляли тРНК^{Leu} до концентрации 16 мкМ, связывание регистрировали по кривой флуориметрического титрования, как описано выше.

Параллельно с флуоресцентными измерениями проводили изучение влияния модификации 2-окси-5-нитробензилбромидом на активность лейцил-тРНК-синтетазы в реакции аминокислотирования. Все опыты по модификации триптофановых остатков 2-окси-5-нитробензилбромидом проводили в растворе, насыщенном азотом.

Спектры флуоресценции регистрировали на серийном спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 путем автоматического сканирования в интервале длин волн 300—450 нм в режиме сравнения. Триптофановую флуоресценцию возбуждали при 296 нм. Флуоресценцию измеряли в кварцевых прямоугольных кюветах с длиной оптического пути 1 см при $20 \pm 1^\circ \text{C}$. В измеренные интенсивности флуоресценции вводили поправку на спектральную чувствительность прибора. Все используемые растворы контролировали на отсутствие флуоресцирующих примесей. Опыты по флуориметрическому титрованию проводили непосредственно в кювете спектрофлуориметра. При обработке данных учитывали эффект разбавления исходного раствора фермента.

Содержание тирозина определяли в нативном и модифицированном ферменте в 0,1 М КОН согласно работе [16], определяя прирост оптического поглощения при 295 нм:

$$N_{\text{Тур}} = \Delta E_{295} / \Delta \epsilon_{295} c, \quad (3)$$

где E_{295} — прирост оптического поглощения при ионизации тирозина, $\Delta \epsilon_{295} = 2480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ — коэффициент молярного поглощения ионизированного в щелочной среде тирозина, c — молярная концентрация белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудзера О. И., Ельская А. В., Овчаренко Г. В., Иванов Л. Л., Багурина И. Д., Мацука Г. Х. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 3, с. 550—558.
2. Корнелюк А. И., Мацука Г. Х., Шилин В. В. Биофизика, 1980, т. 25, № 3, с. 402—404.
3. Корнелюк А. И. Исследование взаимодействий лейцил-тРНК-синтетазы с субстратами методом люминесцентной спектроскопии. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР. Киев, 1981. 22 с.
4. Бушштейн Э. А. Собственная люминесценция белков. Природа и применение. Итоги науки и техники, сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1977, т. 7, с. 213.
5. Burstein E. A., Vedenkina N. S., Ivkova M. N. Photochem. Photobiol., 1973, v. 18, № 2, p. 263—279.
6. Spande T. E., Witkop B. In: Methods in Enzymology. New York — London: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 506—532.
7. Irie M., Harada M., Savada F. J. Biochem., 1972, v. 72, № 6, p. 1351—1359.
8. Sanda A., Irie M. J. Biochem., 1980, v. 87, № 4, p. 1079—1087.
9. Holmgren A. Biochemistry, 1981, v. 20, № 11, p. 3204—3207.
10. Bjork I., Nordling K. Eur. J. Biochem., 1979, v. 102, № 3, p. 497—502.
11. Freisheim J., Ericsson L., Bitar K. G., Dunlap R., Reddy A. Arch. Biochem. and Biophys., 1977, v. 180, № 2, p. 310—317.
12. Голубенко И. А., Лещинская И. Б., Дудкин С. М. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 8, с. 1201—1208.
13. Ахрем А. А., Свиридов О. В., Стрельченко О. А., Прищепов А. С. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 662—669.

14. *Кашипаров И. А., Семисотнов Г. В., Алахов Ю. Б.* Биохимия, 1981, т. 46, № 8, с. 1488—1498.
15. *Spande T. E., Witkop B.* In: *Methods in Enzymol.* New York — London: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 498—506.
16. *Goodvin T., Morton R.* Biochem. J., 1946, v. 40, № 4, p. 628—632.
17. *Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A., Phillips D. C., Sarma V. R.* Proc. Roy. Soc., 1967, B. 167, № 2, p. 378—388.
18. *Ornstein M., Davis J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 321—330.
19. *Weber K., Osborn M. J.* Biol. Chem., 1969, v. 144, № 16, p. 4406—4412.
20. *Lemoine F., Waller J.-P., von Rapenbuch R.* Eur. J. Biochem., 1968, v. 4, № 1, p. 213—221.
21. *London G. M., Koshland D. E. J.* Biol. Chem., 1970, v. 245, № 9, p. 2247—2254.

Поступила в редакцию
18.X.1984

CHEMICAL MODIFICATIONS OF TRYPTOPHAN RESIDUES OF LEUCYL-tRNA SYNTHETASE BY N-BROMOSUCCINIMIDE AND] 2-HYDROXY-5-NITROBENZYL-BROMIDE

KORNELIYUK A. I., SHILIN V. V., GUDZERA O. I., ROZHKO O. T.,
MATSUKA G. Kh.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev*

The structural accessibility of tryptophan residues in leucyl-tRNA synthetase from cow mammary gland has been studied using chemical modifications by N-bromosuccinimide and 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromide. The modifications were monitored by UV absorbance and intrinsic fluorescence of the enzyme's tryptophan residues. Under native conditions, at pH 7.8, only two exposed tryptophan residues are modified in each subunit of the dimeric enzyme. Under denaturing conditions, in 6 M guanidine hydrochloride solution, internal tryptophan residues are also modified as a consequence of unfolding of the native tertiary structure of the enzyme. Modifications of tryptophan residues resulted in inactivation of leucyl-tRNA synthetase both in aminoacylation and ATP - PP_i exchange reactions. In the specific complex of leucyl-tRNA synthetase with the cognate tRNA^{Leu} one of exposed tryptophan residues is protected by tRNA^{Leu} and is not modified by the above reagents.