

analysis of the success in study in the nine subjects of the three blocks (humanities, natural and formal disciplines) reveal a direct correlation of speed of reaction when performing the complex Stroop test in both the native and English languages with the success in the learning English language, what may indicate on special dependence of the success from interhemispheric interaction. In order for the foreign language to be automated and become "all the more native", it is needed the fast access of the executive structures of the brain, such as the front-parietal neural network, to the linguistic neural networks, presented in both hemispheres. According to literature, the inhibitory control mechanism from the dorsolateral prefrontal cortex as the key structure of the front-parietal brain system may be one of several mechanisms underlying bilingual superiority. The results obtained by us complement this conception, indicating the importance of the speed of interhemispheric interaction.

Key words: success in study, task of Stroop, tasks of Poffenberger, interhemispheric transfer of information, foreign language.

УДК 577.217.5

О. Цуварєв, асист.  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна,  
Л. Коломієць, в. о. наук. співроб., В. Заєць, канд. біол. наук, І. Блащак, студ.,  
О. Корнелюк, д-р біол. наук  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

## ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНОГО N-КІНЦЕВОГО КАТАЛІТИЧНОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ *B. TAURUS* ІЗ ЗАМІНОЮ Trp 87 ТА Trp 283 НА АЛАНІН

Аміноацил-тРНК синтетаза є одним із основних ферментів білкового синтезу. Тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS) складається із двох структурних одиниць, N-кінцевого каталітичного (міні TyrRS) та C-кінцевого цитокіно-подібного модулів. У повнорозмірній TyrRS N-кінцевий модуль здійснює каталітичну функцію зв'язування амінокислоти із тРНК, тоді як C-модуль корегує та стабілізує розміщення тРНК в активному центрі фермента. Після розщеплення тирозил-тРНК синтетази еластазою на міні TyrRS та C-модуль, останні виявляють цитокінові властивості. Метою роботи була оптимізація експресії клонованої у плазміді pET30a-39KYRS кДНК міні TyrRS *Bos taurus*, в якій за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу кодони триптофана в положенні 87 та 283 замінені на кодони аланіна, та отримання мутантного однотриптофанового білка міні BtTyrRS для подальшого дослідження за допомогою методів флуоресцентної спектроскопії конформаційних змін фермента на стадії утворення тирозилденілату та при взаємодії з акцепторним кінцем тРНК<sup>Tyr</sup>, а також визначення впливу залишків триптофану в положенні 87 та 283 в його структурі на структурно-динамічні й функціональні властивості ензиму. Установлено, що заміна двох кодонів амінокислоти триптофана на кодони амінокислоти аланіна в кДНК міні BtTyrRS, клонованої в експресуючій плазміді pET30a-39KYRSW40, не впливає на синтез і розчинність мутантної форми ферменту в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Кількість розчинної форми рекомбінантної мутантної міні BtTyrRS у цитоплазмі бактеріальних клітин при експресії в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE значно підвищується при інкубації бактеріальної культури за температури 25° С порівняно з температурою інкубації при 37° С. Вихід отриманого очищеного білка мутантної міні BtTyrRS становить у середньому 2,5 мг із 100 мл культурального середовища, що є достатнім для проведення подальших структурно-функціональних досліджень мутантної форми ферменту. Методом флуоресцентної спектроскопії показано компактну структуру рекомбінантного білка.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, міні TyrRS, бактеріальна експресія.

**Вступ.** Аміноацил-тРНК синтетаза (APCаза) є одним із основних ферментів білкового синтезу. На дорибосомному етапі трансляції у високоспецифічній енергозалежній реакції синтетаза каталізує активацію амінокислоти та приєднання її до гомологічної транспортної РНК, здійснюючи таким чином першу стадію декодування інформації про структуру білка, закладену в нуклеотидні послідовності ДНК та РНК [1, 2].

Тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* складається із двох структурних модулів, N-кінцевого каталітичного (відповідає укороченій формі фермента міні BtTyrRS, 342 а.з., 39 кДа) та C-кінцевого цитокіноподібного (166 а.з., 20 кДа) [2]. У повнорозмірній BtTyrRS (528 а.з., 59,2 кДа) N-кінцевий модуль здійснює каталітичну функцію ковалентного зв'язування відповідної амінокислоти із тРНК, тоді як C-модуль корегує та стабілізує розміщення тРНК в активному центрі фермента [1, 2]. Після розщеплення тирозил-тРНК синтетази еластазою на міні BtTyrRS та C-модуль останні виявляють цитокінові властивості [3–5].

Тести на цитокінову активність NH<sub>2</sub>-кінцевого каталітичного домену TyrRS виявили, що міні TyrRS є хемотоксичним фактором для нейтрофілів, а також стимулює ангиогенез по концентраційно залежному шляху. Уважається, що цитокінова активність міні TyrRS опосередковується консервативним мотивом ELR у каталітичному домені синтетази [4–5].

У фізіологічних умовах тирозил-тРНК синтетаза *Bos taurus* являє собою гомодимер α<sub>2</sub> типу, мономером якого є повнорозмірний фермент. При виділенні BtTyrRS із печінки бика було показано, що поряд із основною фо-

рмою виділяється також і функціонально активна протеолітично модифікована форма тирозил-тРНК синтетази з молекулярною вагою 39 кДа, яка має повну ферментативну активність в експериментах *in vitro* [2, 6–7].

Оскільки N-кінцевий каталітичний модуль синтетази являє собою інтерлейкін-подібний цитокін і виявляє проангіогенні властивості, він є перспективним об'єктом для досліджень з метою можливого використання в подальшому в якості лікарських препаратів.

У структурі каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази містяться три залишки триптофану W40, W87 і W283, які розташовані, відповідно, в активному центрі ферменту, в області димеризації мономерів міні BtTyrRS та в сайті зв'язування триплета антикодону тРНК<sup>Tyr</sup>. Таке розташування залишків триптофану в амінокислотній послідовності білка робить дуже перспективним дослідження його властивостей методами флуоресцентної спектроскопії за умов наявності лише одного залишка в кожному із трьох положень у структурі ферменту. У зв'язку з цим за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу ми замінили в кДНК міні BtTyrRS, клонованої в плазміді pET30a-39KYRS, кодони Trp87 та Trp283 на кодони аланіну, залишивши лише один кодон триптофану в каталітичному центрі ферменту W40 (Стаття подана до друку).

Метою нашої роботи було отримання даного рекомбінантного однотриптофанового білка міні BtTyrRS для подальшого дослідження конформаційних змін фермента на стадії утворення тирозилденілату та при взаємодії з акцепторним кінцем тРНК<sup>Tyr</sup>, а також визначення впливу залишків триптофану в положенні 87 та 283 у

його структурі на структурно-динамічні та функціональні властивості ензиму.

На сьогодні запроваджено декілька гетерологічних експресійних систем для отримання рекомбінантних білків. Вони засновані на клітинних лініях ссавців, клітинах дріжджів і бактерій, а також клітинних лініях комах [8]. Серед них найбільшим попитом користується бактеріальна система *E. coli*. Експресія білків у *E. coli* є недорогим, швидким і простим методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у великих кількостях у нативному стані [9, 10]. Ми використали в нашій роботі бактеріальну систему *E. coli* для синтезу мутантної форми міні TyrRS *Bos taurus*.

**Матеріали і методи.** У роботі використовували штам-продуцент рекомбінантного білка, отриманий на основі реципієнта *E. coli* BL21(DE3)pLysE (Stratagene, США), трансформованого відповідною конструкцією за загально прийнятою методикою [11]. Плазмідна конструкція pET30a-39KYRSW40 була створена на базі вектора pET-30a(+) ("Novagen", США) і містила кДНК, що кодує синтез мутантної по залишках триптофанів у положенні 87 та 283 міні BtTyrRS під контролем промотора фага T7. Селективним маркером плазміді pET30a(+) є ген, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотика канаміцину. Плазмідну ДНК виділяли за допомогою кіта Gene JET Plasmid Miniprep Kit фірми "Thermo Scientific". Концентрацію плазмідної ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 ("Thermo Scientific").

Для отримання рекомбінантної плазміді pET30a-39KYRSW40, трансформації її у клітини *E. coli* та експресії кДНК каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* використовували відповідно генно-інженерні штами *E. coli* DH5 $\alpha$  та BL21(DE3)pLysE. Компетентні клітини *E. coli* отримували відповідно до методів Нішимури і співавторів [12] та Іное [13]. Усі процедури із трансформації плазмідної ДНК, що кодує послідовність мутантної міні BtTyrRS, проводили згідно із [13]. Плазмідні конструкції аналізували методом електрофорезу в 0,7–1 % агарозному гелі.

Вирощування культури *E. coli* та індукцію експресії рекомбінантної міні BtTyrPC у бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бертані (LB) із 30 мкг/мл антибіотика канаміцину. Трансформовані рекомбінантною плазмідною pET30a-39KYRSW40 компетентні клітини *E. coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на шейкері (Environmental Shaker Incubator ES-20) при 37° С до оптичної густини  $A_{600} = 0,7$  та індукували синтез цільового білка додаванням 1 М ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактопіранозиду (IPTG) до 1 мМ концентрації з наступною інкубацією при 37° С та 25° С упродовж 4 та 16 год відповідно. Зібрану біомасу зі 100 мл культури ресуспендували у 12 мл буфера для лізису клітин (50 мМ натрій-фосфатний буфер, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол). Лізис проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗ-озвучуванням (шість циклів по 20 с, інтервали 20 с). Лізат освітлювали центрифугуванням при 13000 об/хв

упродовж 30 хв при 4° С. Супернатант наносили на врівноважену буфером для лізису клітин Ni-NTA агарозну колонку об'ємом 1 мл, промивали 10 мл буфера для промивки (50 мМ натрій-фосфатний буфер, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол). Рекомбінантний білок елюювали 5 мл буфера для елюції (50 мМ натрій-фосфатного буфер, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол). Фракції, у яких було виявлено білок, об'єднували і діалізували проти 200 мл буфера для діалізу (500 мМ натрій-фосфатний буфер pH 8,0, 150 мМ NaCl) упродовж 20-ти год при +4° С. Електрофоретичний аналіз експресії рекомбінантного білка та елюату проводили у 12 % поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах буферної системи Леммлі [14]. Гелі фарбували барвником Coomassie blue R250. Концентрацію очищеного мутантного білка міні BtTyrRS визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі BioMate 5, використовуючи коефіцієнт екстинкції 9970M $\cdot$ cm $^{-1}$  за довжини хвилі 280 нм. Коефіцієнт оптичного поглинання визначали за даними амінокислотного аналізу за допомогою програми ProtParam.

Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який був обладнаний термостатованим кюветотримачем. Температуру в кюветі визначали з точністю до +0,2° С. Вимірювання проводили у кварцевій 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 нм, інтервал довжини хвиль для спектрів флуоресценції становив 300–400 нм, реєстрацію флуоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджуючого світла за температури 25° С.

**Результати та їх обговорення.** У відділі білкової інженерії і біоінформатики Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ було отримано, клоновано та секвеновано повну нуклеотидну послідовність кДНК гену тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* [15], а також створено експресуючі конструкції pET-30a(+)-59KYRS та pET-30a(+)-39KYRS, які містили, відповідно, вставки кДНК повнорозмірної BtTyrRS (M1–S528) та каталітичного N-кінцевого модуля синтетази (M1–P342). Вставка кДНК міні BtTyrRS містила також послідовність нуклеотидів, які кодують міжмодульний лінкер (D343–E359), 10 а.з. C-модуля (P360–D369), 42 N-кінцеві амінокислоти вектора та 12 залишків полілінкера плазміді (Дубровський О. Л., неопубліковані дані). Експресовані у штами *E. coli* BL21 (DE3) рекомбінантні білки зберігали аміноацилюючу здатність, притаманну для нативної аміноацил-тРНК синтетази. Було побудовано комп'ютерну модель структурної організації N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS *Bos taurus* [16]. Цю модель просторової структури гомодимера міні BtTyrRS із виділеними трьома триптофановими залишками в положенні 40, 87 та 283 у її структурі наведено на рис. 1.



Рис. 1. Модель просторової структури димера N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus*

Клоновані у плазмідах рЕТ-30а-59KYRS та рЕТ-30а-39KYRS кДНК повнорозмірної тирозил-т-РНК синтетази *BtTyrRS* та міні *BtTyrRS* були використані для отримання кодованих ними рекомбінантних білків у системі *E. coli* BL21(DE3)pLysE після трансформації плазмід у бактеріальні клітини. Оскільки кінцевий вихід цільового рекомбінантного білка в бактеріальних системах значною мірою залежить від умов культивування, було експериментально визначено оптимальні параметри для експресії *BtTyrRS* та міні *BtTyrRS* у *E. coli* [17–18]. У роботах досліджувався вплив на експресію *BtTyrRS* і міні *BtTyrRS* таких основних факторів, як кількість індуктора синтезу білка, що вноситься в культуральне середовище, температура та час культивування культури до та після додавання індуктора.

Було показано, що найбільш високий рівень синтезу рекомбінантної міні *BtTyrRS* у *E. coli* досягався при додаванні в культуру індуктора синтезу IPTG у концентрації 1 мМ на 2 години культивування при досягнанні культурою оптичної густини  $OD_{600} = 0,7–0,9$  та інкубації упродовж 4 год за 37° С.

Ми використали ці умови культивування клітин *E. coli* штаму BL21(DE3)pLysE, трансформованих плазмідною рЕТ30а-39KYRSW40, що кодує синтез мутантного по залишках триптофанів у положенні 87 та 283 каталітичного модуля аміноацил-тРНК синтетази, для отримання мутантної міні *BtTyrRS*. Оскільки відомо, що послідовність клонованих генів в експресуючих векторах серії рЕТ із надзвичайно сильним промотором фага Т7 відіграє значну роль як у синтезі рекомбінантних білків, так і в отриманні розчинної фракції новосинтезованих білків, заміна двох кодонів триптофану на кодони аланіну в структурі міні *BtTyrRS* у нашому випадку могла бути критичною і призвести до зниження синтезу ензиму чи його переходу в нерозчинні тільки включення [19]. Тому ми провели одночасно експресію в *E. coli* мутантної та нативної форм міні *BtTyrRS* із плазмід рЕТ-30а(+)-39KYRS і рЕТ30а-39KYRSW40. Як видно з електрофореграми на рис. 2, мутації не вплинули на експресію мутантного білка: кількість синтезованих у бактеріальній культурі після індукції IPTG нативної та мутантної форм каталітичного модуля тирозил-т-РНК синтетази практично однакова.

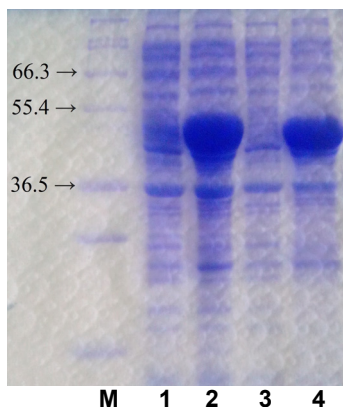


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз експресії нативної та мутантної форм каталітичного модуля тирозинової аміноацил-тРНК синтетази у штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE

М – Маркерна суміш білків ("Invitrogen", Mark 12 Unstained Standart)  
 1 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ-30а(+)-39KYRS штаму BL21(DE3)pLysE до індукції IPTG (контроль)  
 2 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ-30а(+)-39KYRS штаму BL21(DE3)pLysE після індукції IPTG (контроль)  
 3 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW40 штаму BL21(DE3)pLysE до індукції IPTG  
 4 – Клітинний лізат бактеріальної культури трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW40 штаму BL21(DE3)pLysE після індукції IPTG

Аналіз клітинного осаду після освітлювання бактеріальних лізатів у процесі виділення білків показав, що значна кількість як контрольної, так і мутантної форми ензиму все ж знаходяться в цитоплазмі в нерозчинній фракції в тільцях включення приблизно в рівних пропорціях (результати не наведено). Хоча розчинна фракція білка в обох випадках дозволяє отримати достатню кількість рекомбінантних білків для дослідження їх властивостей як біохімічними, так і флуоресцентними методами, було вирішено проаналізувати синтез цільово-

го білка в культурі *E. coli* штаму BL21(DE3)pLysE після індукції IPTG за температури інкубації 25° С. Результати показали в 1,5 рази вищу концентрацію синтезованого білка в розчинній фракції. Після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарозі із 100 мл бактеріальної культури було отримано з урахуванням коефіцієнта екстинції 27850 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> до 2,5 мг гомогенного рекомбінантного мутантного білка міні *BtTyrRS*, чистота якого згідно з електрофорезом досягає 95 % (рис. 3).

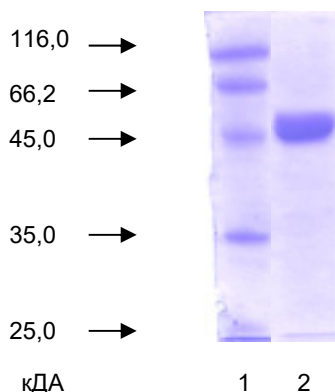


Рис. 3. Електрофоретичний контроль чистоти мутантного білка 39 К TyrRS після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарозі (12-відсотковий розділюючий гель)

1 – маркерна суміш (Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 Fermentas)  
2 – мутантна міні-TyrRS (39 kDa)

Флуоресцентні характеристики отриманого білка, зокрема ширина спектра флуоресценції  $\Delta\lambda$  біля 55 нм та його максимум, що припадає на 328 нм, показують

екранування залишку триптофана 40 W гідрофобним мікрооточенням в активному центрі мутантної форми фермента (рис. 4).

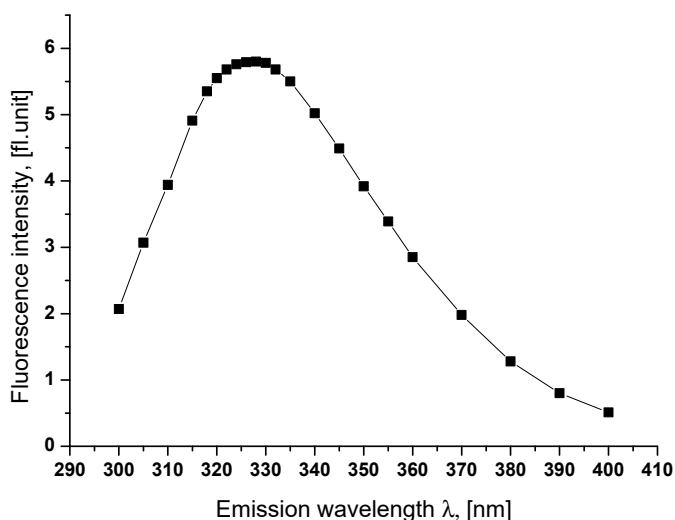


Рис. 4. Спектр флуоресценції мутантної форми W87/283A каталітичного модуля тирозил-тРНКсинтетази *B. taurus* за довжини хвилі збудження 280 нм

Це свідчить про компактний стан отриманого білка і нативність його структури [20]. За даними сервера ProtParam, молекулярна вага отриманої мутантної міні *BtTyrRS* дорівнює 47364,36 Да, ізоелектрична точка рІ дорівнює 6,42.

**Висновки.** У результаті проведеної роботи нами показано, що заміна двох кодонів амінокислоти триптофана на кодони амінокислоти аланіна в кДНК каталітичного модуля тирозинової аміноацил-тРНК синтетази, клонованої в експресуючому векторі pET30a-

39KYRSW40, не впливає на синтез та розчинність мутантної форми ферменту в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Кількість розчинної форми рекомбінантної мутантної міні *BtTyrRS* у цитоплазмі бактеріальних клітин при експресії у штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE значно підвищується при інкубації бактеріальної культури за температури 25° С порівняно з температурою інкубації 37° С. Вихід очищеного гомогенного білка мутантної міні *BtTyrRS* становить у середньому 2,5 мг із 100 мл культурального середовища, що є достатнім для проведення пода-

льших структурно-функціональних досліджень мутантної форми ферменту.

#### Список використаних джерел:

1. Pang Y. L. J. tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond / Y. L. J. Pang, K. Poruri, S. A. Martinis // WIREs RNA. – 2014. – Vol. 5, N 4. – P. 461–480.
2. Kornelyuk A. I. Structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolym. Cell. – 1998. – Vol. 14, N 4. – P. 349–359.
3. Kornelyuk A. I. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / A. I. Kornelyuk, M. P. Tas, A. Dubrovsky et al. // Biopolymers and Cell. – 1999. – Vol. 15, N 2. – P. 168–72.
4. Wakasugi K. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase / K. Wakasugi, B. M. Slike, J. Hood et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, N 23. – P. 20124–20126.
5. Guo M. Essential nontranslational function of tRNA synthetases / M. Guo M., P. Schimmel // Nature Chemical Biology. – 2013. – Vol. 9, N 3. – P. 145–153.
6. Корнелюк А. И. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства / А. И. Корнелюк, И. В. Курочкин, Г. Х. Мацука // Молекулярная биология. – 1988. – Т. 22, N 1. – С. 176–186.
7. Gnatenko D. V. Isolation and characteristics of functionally active proteolytically modified form of tyrosyl-tRNA synthetase from the bovine liver / D. V. Gnatenko, A. I. Kornelyuk, I. V. Kurochkin et al. // Ukr. Biochem. J. – 1991. – Vol. 63, N 4. – P. 61–67.
8. Demain A. L. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms / A. L. Demain, P. Vaishnav // Biotechnol. Adv. – 2009. – Vol. 27, N 3. – P. 297–306.
9. Sahdev S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies / S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 307, № 2. – P. 249–264.
10. Rosano G. L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / G. L. Rosano, E. A. Cessarelli // Frontiers in Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.
11. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / J. Sambrook, T. Fritsch, T. Maniatis. – 2nd ed. – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Nishimura A. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells / A. Nishimura, M. Morita, Y. Nishimura et al. // Nucl. Acids Res. – 1990. – Vol. 18, № 20. – P. 6169.
13. Inoue H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // Gene. – 1990. – Vol. 96. – P. 23–28.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
15. Levanets O. V. PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleotide binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / O. V. Levanets, V. G. Naidenov, M. I. Woodmaska et al. // Biopolym. Cell. – 1996. – Vol. 12, № 5. – P. 66–70.
16. Kravchuk O. V. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates / O. V. Kravchuk, O. V. Savitskiy, K. O. Odynets // J. Biomol. Struct. Dynamics. – 2016. – Vol. 35, № 13. – P. 2772–2788.
17. Кондратюк Ю. Оптимізація процесу біосинтезу каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази свавців та його дослідження імунохімічними методами / Ю. Кондратюк, М. Бабарик, Л. Сидорик та ін. // Вісн. Київ. ун-ту. Серія Біологія. – 2010. – Т. 56. – С. 33–35.
18. Кондратюк Ю. Оптимізація бактеріальної експресії тирозил-тРНК синтетази свавців при культивуванні штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) *pLysE* / Ю. Ю. Кондратюк, М. А. Бабарик, О. І. Корнелюк // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – Т. 8. – С. 6–12.
19. Studier F. W. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes / F. W. Studier, B. A. Moffatt // J. Mol. Biol. – 1986. – Vol. 189, N 1. – P. 113–30.
20. Reshetnyak Y. K. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins / Y. K. Reshetnyak, E. A. Burnstein // Biophysical J. – 2001. – Vol. 81. – P. 1710–1734.

А. Цуварев, асист.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна,  
Л. Коломиец, и. о. научн. сотруд., В. Заец, канд. биол. наук, И. Блащак, студ.,  
А. Корнелюк, д-р биол. наук  
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

#### References (Scopus):

1. Pang YLJ, Poruri K, Martinis SA. tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. WIREs RNA. 2014; 5(4): 461–480.
2. Kornelyuk AI. Structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolym. Cell. 1998; 14(4):349–359.
3. Kornelyuk A.I, Tas M.P., Dubrovsky A., Murray C. J. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolym Cell. 1999; 15(2): 168–72.
4. Wakasugi, Slike BM, Hood J [et al.]. Induction of angiogenesis by the fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. J Biol Chem. 2002; 277(23): 20124–20126.
5. Guo M., Schimmel P. Essential nontranslational function of tRNA synthetases. Nat Chem Biol. 2013; 9(3): 145–153.
6. Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мацука Г.Х. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства. Молекулярная биология. 1988; 22(1):176–186.
7. Gnatenko D.V., Kornelyuk A.I., Kurochkin I.V., Ribkinska T.A., Matsuka GKh, Isolation and characteristics of functionally active proteolytically modified form of tyrosyl-tRNA synthetase from the bovine liver. Ukr Biochem J. 1991;63(4): 61–67.
8. Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organism. Biotechnol Adv. 2009; 27(3): 297–306.
9. Sahdev S., Khattar S.K., Saini K.S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008; 307(2): 249–264.
10. Rosano G.L., Cessarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 2014; 5:1–17.
11. Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2th ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucl Acids Res. 1990; 18(20): 6169.
13. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids. Gene. 1990; 96: 23–28.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680–685.
15. Levanets O.V., Naidenov V.G., Woodmaska M.I., Odynets K.A., Matsuka G.H., Kornelyuk A.I. PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleotide binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. Biopolym Cell. 1996; 12(5):66–70.
16. Kravchuk O.V., Savitskiy O.V., Odynets K.O., Mykuliak V.V., Korneliuk A.I. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates. J Biomol Struct Dynamics. 2016; 35(13): 2772–2788.
17. Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М., Сидорик Л., Корнелюк О. Оптимізація процесу біосинтезу каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази свавців та його дослідження імунохімічними методами. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія Біологія. 2010; 56:33–35.
18. Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М.А., Корнелюк О.І. Оптимізація бактеріальної експресії тирозил-тРНК синтетази свавців при культивуванні штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) *pLysE*. Мікробіологія і біотехнологія. 2009; 8:6–12.
19. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. J Mol Biol. 1986; 189(1):113–30.
20. Reshetnyak Y.K., Burnstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. Biophysical J. 2001; 81:1710–1734.

Надійшла до редколегії 05.03.2019  
Отримано виправлений варіант 08.04.2019  
Підписано до друку 08.04.2019

Received in the editorial 05.03.2019  
Received a revised version on 08.04.2019  
Signed in the press on 08.04.2019

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНОГО N-КОНЦЕВОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ В. TAURUS С ЗАМЕНОЙ Trp 87 И Trp 283 НА АЛАНИН

Аминоацил-тРНК синтетаза является одним из основных ферментов белкового синтеза. Тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS) млекопитающих состоит из двух структурных единиц, N-концевого каталитического (мини TyrRS) и C-концевого цитоплазматического модулей. В полноразмерной TyrRS N-концевой модуль осуществляет каталитическую функцию связывания аминокислоты с тРНК, тогда как C-модуль корректирует и стабилизирует размещения тРНК в активном центре фермента. После расщепления тирозил-тРНК синтетазы эластазой на мини TyrRS и C-модуль, последние проявляют цитоплазматические свойства.

Целью работы была оптимизация экспрессии клонированной в плазмиде pET30a-39KYRS кДНК мини TyrRS *Bos taurus*, в которой с помощью сайт-направленного мутагенеза кодона триптофана в положении 87 и 283 заменены на кодоны аланина и получение мутантного одотриптофанового белка мини BtTyrRS для дальнейшего исследования с помощью методов флуоресцентной спектроскопии конформационных изменений фермента на стадии образования тирозиладенилата и при взаимодействии с акцепторным концом тРНК<sup>Tyr</sup>, а также определение влияния остатков триптофана в положении 87 и 283 в его структуре на структурно-динамические и функциональные свойства фермента.

Установлено, что замена двух кодонов триптофана на кодоны аланина в кДНК мини TyrRS, клонированной в экспрессирующей плазмиде pET30a-39KYRSW40, не влияет на синтез и растворимость мутантной формы фермента в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. Количество растворимой формы рекомбинантной мутантной мини BtTyrRS в цитоплазме бактериальных клеток при экспрессии в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLysE значительно повышается при инкубации бактериальной культуры при температуре 25° С по сравнению с температурой инкубации при 37° С. Выход полученного очищенного белка мутантной мини BtTyrRS составляет в среднем 2,5 мг с 100 мл культуральной среды, что является достаточным для проведения дальнейших структурно-функциональных исследований мутантной формы фермента. Методом флуоресцентной спектроскопии показана компактная структура рекомбинантного белка.

**Ключевые слова:** тирозил-тРНК синтетазы, мини TyrRS, бактериальная экспрессия.

O. Tsuvarev, assistant

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,

L. Kolomiets, research assistant., V. Zayets, Ph.D., I. Blaszcak, student., A. Kornelyuk, Dr.Sc.

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE MUTANT N-TERMINAL CATALYTICAL MODULE OF THE *B. TAURUS* TYROSYL-tRNA SYNTHETASE WITH THE REPLACEMENT OF Trp 87 AND Trp 283 BY ALANINE

Aminoacyl-tRNA synthetase is one of the major enzymes of protein synthesis. The mammalian tyrosyl-tRNA synthetase consists of two structural units, the N-terminal catalytic (mini TyrRS) and the C-terminal cytokine-like modules. In a full length TyrRS, the N-terminal module carries out the catalytic function of binding the amino acid to tRNA, while the C-module adjusts and stabilizes the placement of tRNA in the active center of the enzyme. After cleavage of tyrosyl-tRNA synthetase with elastase on the mini TyrRS and C-module, the latter exhibit cytokine properties.

The aim of the work was to optimize the expression of cloned cDNA miniTyrRS *Bos taurus* in plasmid pET30a-39KYRS in which the tryptophan codons at position 87 and 283 are replaced with alanine codons using the site-directed mutagenesis, and to obtain the mutant one-tryptophan protein of the mini BtTyrRS for further study on using methods of fluorescence spectroscopy of conformational changes of the enzyme at the stage of tyrosyladenylate formation and in interaction with the acceptor end of tRNA<sup>Tyr</sup>, as well as determination of the effect of tryptophan residues in positions 87 and 283 in its structure on the structurally dynamic and functional properties of the enzyme.

It was found that the replacement of two tryptophan codons into the alanine codons in the cDNA of the mini TyrRS cloned in the expressing plasmid pET30a-39KYRSW40 does not affect the synthesis and solubility of the mutant form of the enzyme in the strain *E. coli* BL21 (DE3) pLysE. The amount of soluble form of the recombinant mutant mini BtTyrRS in the cytoplasm of bacterial cells, when expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE strain, is significantly enhanced by incubation of bacterial culture at a temperature 25 ° C compared to a culture incubation at 37 ° C. The yield of the obtained purified protein of the mutant mini BtTyrRS is 2.5 mg per average from 100 ml of culture medium, which is sufficient for further structural and functional studies of the mutant form of the enzyme. The compact structure of the recombinant protein is shown by fluorescence spectroscopy.

**Key words:** tyrosyl-tRNA synthetase, mini TyrRS, bacterial expression.

UDK 57.084.1:615.357:616-091.814:616-056.527

O. Kalmukova, Ph. D stud., T. Kushmyruk, stud., M. Dzerzhynsky, Dr. Sc.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

## THE EFFECTS OF MELATONIN ADMINISTRATION IN DETERMINED TIMES OF DAY ON THE KIDNEY IN RATS WITH HIGH-CALORIE DIET-INDUCED OBESITY

Kidneys, like the cardiovascular system, are one of the main target organs, the most vulnerable to obesity, because the first take on the metabolism correction function at an increasing excess of fat tissue in the body. Kidney affection under obesity is a multifactorial thing that is caused by a number of processes, including inflammation, oxidative stress, lipid metabolism disorders, renin-angiotensin-aldosterone system activation, insulin resistance and other factors. An optimal candidate for reducing the harmful effects of kidneys obesity should be a compound that simultaneously exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties, controls the circadian rhythm, and also affects on the adipokines secretion. The molecule that meets these conditions is melatonin. The aim of our study was to determine morpho-functional state (morphology characteristic of kidney glomeruli and tubules; morphometric parameters: area and density of glomeruli) of kidney in rats with high-calorie (high fat) diet-induced obesity after melatonin administration in determined time of the day. Melatonin was administered daily by gavage for 7 weeks in dose 30 mg/kg 1 h before lights-off (ZT11) rats with high-calorie diet (HCD). Rats with HCD had huge changes in kidney morphology, which manifested in presence of numerous mesangial cells outside glomeruli and lipid droplets in tubules epithelial cells, while area and density of glomeruli in cm<sup>2</sup> decrease. In general kidney with above mentioned characteristic from HCD rats lose their ability to conduct strongly renal function. After melatonin used in rats with HCD arise leveling of pathological changes, which associated with consumption of HCD. Namely, in rats with development obesity melatonin administrations led to increase area and density in comparison to HCD group, moreover glomeruli density reach control values. This is suggest that melatonin have protecting effect against glomerular degeneration. In conclusions, melatonin influence on kidney morpho-functional state in rats with HCD and turn back pathological its changes, moreover evening administration can use for obesity therapy via its strong action on conservation glomerular morphology.

**Key words:** melatonin, obesity, chronotherapy, kidney, high-fat diet, glomeruli.

**Introduction.** Obesity is one of the main problems of modern society. According to the World Health Organization (WHO), overweight and obesity have become one of the most serious health problems of the 21st century and are recognized as an emerging chronic non-infectious "pandemic" [1]. Obesity is a chronic, reverse disease characterized by fat deposits and an increase in body weight due to adipose tissue. It can be the cause the development of type 2 diabetes, impaired reproductive system functions, cardiovascular, and is accompanied by complications such

as chronic kidney disease. Kidneys, like the cardiovascular system, are the main target organs, which sensitive to obesity, because some of the first take on the metabolism correction function during increasing excess of adipose tissue in the body [2].

Kidney affection during obesity is a multifactorial phenomenon caused by a number of processes, including inflammation, oxidative stress, lipid metabolism disorders, activation of the renin-angiotensin-aldosterone system, increased insulin production, and the formation of insulin