

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Нипорко

Протокол №\_\_ засідання кафедри

від “\_\_” \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ ВЗАЄМОДІЇ ЛЮДСЬКОЇ ЛЕЙЦИЛ-  
ТРНК СИНТЕТАЗИ З ЛІГАНДАМИ МЕТОДОМ  
СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студентки спеціальності 091

Біологія

ОП “Біологія (високі технології)”

**Гармаш Дар’ї Василівни**

Науковий керівник від кафедри

Завідувач кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

доц. **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана на базі відділу ензимології білкового синтезу

Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

під керівництвом д.б.н. **Михайла Арсентійовича Тукала**

Оцінка захисту роботи

---

м. Київ – 2024 р.

## АНОТАЦІЯ

Гармаш Д.В. Дослідження кінетики взаємодії людської лейцил-тРНК синтетази з лігандами методом спектрофлуориметрії, 45 с. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)» спеціалізацією «Молекулярні біотехнології».

У роботі було проведено рекомбінатна експресія та очищення людської лейцил-тРНК синтетази, після чого моніторингом гасіння внутрішньої флуоресценції протеїну було оцінена його взаємодія зі спорідненою амінокислотою та її непротеїногенними аналогами норваліном та гомоцистеїном. Також був оцінений вплив попередньої інкубації протеїну з АТФ та некаталітичним АТФ $\alpha$ S на цю взаємодію. Норвалін та гомоцистеїн здатні взаємодіяти з ЛейРСазою *in vitro*. До того ж, спорідненість усіх трьох досліджуваних амінокислот збільшується у подібній мірі в присутності АТФ та АТФ $\alpha$ S.

Отримані результати можуть бути використані для аналізу доцільності та стратегії подальших молекулярних та структурних досліджень різноманітних механізмів ЛейРСаза-опосередкованого сигналінгу.

**Ключові слова:** лейцил-тРНК синтетаза (ЛейРСаза), mTORC1, норвалін, гомоцистеїн, внутрішня флуоресценція білка.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
1.1 Лейцил-тРНК синтетаза .....	7
1.1.1 Загальна характеристика та канонічна функція аміноацил-тРНК синтетаз .....	7
1.1.2 Неканонічні функції аміноацил-тРНК синтетаз .....	9
1.1.3 Метаболічний шлях mTORC1 .....	10
1.1.4 ЛейРС-опосередкована активація mTORC1 .....	11
1.2 Хімічні аналоги лейцину .....	14
1.2.1 Дискримінація субстратів ЛейРСазою .....	14
1.2.2 Норвалін .....	14
1.2.3 Гомоцистеїн .....	15
1.3 Протеїн-ліганд взаємодії .....	15
1.3.1 Методи дослідження протеїн-ліганд взаємодій .....	15
1.3.2 Метод моніторингу гасіння внутрішньої флуоресценції протеїну для дослідження протеїн-ліганд взаємодії .....	17
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ .....	20
2.1 Реактиви та розчини .....	20
2.2 Рекомбінатна експресія, виділення та очищення ЛейРСази .....	20
2.3 Спектрофлуориметрія .....	21
2.4 Аналіз результатів спектрофлуориметрії .....	23
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	25
3.1 Дослідження взаємодії L- і D-лейцину та його непротеїногенних аналогів з ЛейРСазою .....	25

3.2 Дослідження взаємодії АТФ та АТФ $\alpha$ S з ЛейРСазою .....	27
3.3 Дослідження впливу попередньо інкубації ЛейРСазу з АТФ та АТФ $\alpha$ S на зв'язування L-лейцину.....	28
3.4 Дослідження впливу попередньо інкубації ЛейРСазу з АТФ та АТФ $\alpha$ S на зв'язування L-гомоцистеїну та L-норваліну .....	29
ВИСНОВКИ.....	32
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	34

## ВСТУП

Об'єктом дослідження є ензим лейцил-тРНК синтетаза (ЛейРСаза), що належить до I класу АРСаз – ензимів, канонічна функція яких полягає в активації та перенесенні на молекулу тРНК споріднених амінокислот для їхнього подальшого включення в поліпептидний ланцюг [1]. Окрім каталітичного сайту, в структурі ЛейРС присутній і редагувальний сайт, що попереджає інкорпорацію в новосинтезовані поліпептиди структурних аналогів лейцину, таких як протеїногенний ізoleyцин та непротеїногенні норвалін і гомоцистеїн [2]. Тим не менш, накопичення в клітинах значних концентрацій норваліну та гомоцистеїну ендо- або екзогенного походження призводить до ряду патологічних станів [3].

Важливою неканонічною функцією ЛейРСази є сенсорування внутрішньоклітинної концентрації лейцину та сприяння активації mTORC1 [4]. Глобальний вплив mTORC1 на основні процеси анаболізму зумовлює *актуальність* у вивченні механізму сигналіngu, в тому числі для розробки таргетованих лікарських препаратів. Наприклад, наразі відомо, що з гіперактивацією mTORC1 асоційований канцерогенез та ряд інших патологічних станів [5]. Вважається, що роль ЛейРСази в сигнальному каскаді полягає у безпосередній взаємодії синтетази з ГТФазою RagD, що через ряд інших факторів сприяє її активації та активації mTORC1. Для взаємодії з RagD ЛейРСаза має перебувати в "*sensing – on*"<sup>++</sup> комплексі, тобто бути зв'язаною з лейцином та АТФ, але не з комплексом лейцил-АМФ [6]. Наразі залишаються невідомими структурні аспекти досягнення диференціації та балансу між канонічною функцією активації лейцину та сигнальною функцією ЛейРСази. Використання нездатних до пірофосфатного розщеплення штучних аналогів АТФ (наприклад, АТФ $\alpha$ S), потенційно може дати змогу «зафіксувати» *sensing – on*<sup>++</sup> комплекс, що є корисним для проведення ряду структурних досліджень. При цьому дослідження матимуть сенс, якщо АТФ $\alpha$ S

повністю мімікрує зв'язування АТФ в потрібному комплексі та не ініціює альтернативні зміни конформації синтетази.

Іншим вартим уваги дослідженням було виявлено, що не тільки лейцин, але і гомоцистеїн здатний до активації mTORC1. Ймовірно, ця активація є ЛейРС-залежною та зумовлює специфічні патологічні наслідки накопичення гомоцистеїну [7]. Проте, структурні аспекти феномену залишаються невідомими.

Отже, *мета роботи* полягала в:

- аналізі можливості ЛейРСаз-опосередкованої активації mTORC1 аналогами лейцину;
- оцінці доцільності використання некаталітичного АТФ $\alpha$ S в структурних дослідженнях з ЛейРСазом.

*Задачами роботи* було:

- За допомогою спектрофлуориметричного методу гасіння внутрішньої флуоресценції білка дослідити *in vitro* взаємодію людської ЛейРСазі зі специфічною амінокислотою та її аналогами;
- Дослідити вплив попередньої інкубації протеїну з АТФ та АТФ $\alpha$ S на кінетику взаємодії ЛейРСаз-амінокислота.

Результати дослідження можуть стати підґрунтям для планування подальших досліджень сигнальної функції ЛейРСазі.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Лейцил-тРНК синтетаза

#### 1.1.1 Загальна характеристика та канонічна функція аміноацил-тРНК синтетаз

Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) є універсальними ензимами організмів прокариот та еукаріот, що забезпечують здійснення першого етапу біосинтезу протеїнів [8]. Роль АРСаз полягає в естерифікації молекули тРНК відповідною спорідненою амінокислотою [9]. Біохімічно цей процес проходить у дві стадії. Спочатку АРСаза забезпечує реакцію активації амінокислоти, що опосередковується пірофосфатним гідролізом АТФ. В результаті активації утворюється комплекс аміноацил-АМФ. Активована амінокислота далі ковалентно приєднується до вільної 2'-ОН або 3'-ОН групи аденозину акцепторного стебла відповідної тРНК з антикодоном комплементарним до кодону мРНК [10,11]. Утворений комплекс аміноацил-тРНК переноситься на А-сайт рибосоми фактором елонгації Tu (EF-Tu) [12].

Сімейство АРСаз клітинах організму людини включає 20 ензимів специфічних до 20 канонічних протеїногенних амінокислот. Існує пул мітохондріальних та цитозольних АРСаз, що загалом кодується 37 генами ядерного геному [13]. Дев'ять АРСаз та три скеффолдні білки (AIMP1, AIMP2 та AIMP3) утворюють так званий мульти-тРНК синтетазний комплекс (MSC). Формування комплексу збільшує ефективність та швидкість аміноацилювання тРНК, а отже і біосинтезу протеїнів [14].

Залежно від структури активного сайту АРСази розділяють на два основні еволюційно різні класи (рис. 1.1). АРСази I класу є мономерними протеїнами. Їхній каталітичний сайт має класичну динуклеотидну укладку Россмана з консенсусними послідовностями HIGH та KMSKS, пептидний остов яких формує водневі зв'язки з лігандами та стабілізує комплекс аміноацил-АМФ [15]. АРСази II класу є ди- або мультимерними. Структура каталітичного сайту цих АРСаз представлена трьома  $\beta$ -шпильками фланкованими  $\alpha$ -спіралями. Високо консервативні мотиви 1, 2 та 3

забезпечують функціональність ензимів. Мотив 1 знаходиться на інтерфейсі між мономерами та забезпечує формування мультимеру, тоді як мотиви 2 та 3 безпосередньо зв'язують АТФ та споріднені амінокислоти, забезпечуючи формування проміжного комплексу [16,17].

Окрім каталізу реакції аміноацилювання тРНК, АРСази контролюють точність біосинтезу поліпептидного ланцюга. Структура каталітичного сайту АРСаз забезпечує преференційну активацію спорідненої амінокислоти. Так, селективність АРСаз до протеїногенних та непротеїногенних аналогів є в середньому на 2-3 порядки вища, аніж для більшості інших родин ензимів, що використовують амінокислоти [18]. Проте подібна селективність не повністю виключає утворення міс-ацильованих тРНК. Редагування таких комплексів може здійснюватися за пре-трансферним або пост-трансферним механізмом [19].

Відоме для СерРСази, ПроРСази та ЛізРСази пре-трансферне редагування полягає в гідролізі комплексу неспоріднена амінокислота-АМФ безпосередньо в каталітичному сайті ензиму до переносу амінокислоти на тРНК [20]. Натомість, пост-трансферне редагування здійснюється завдяки активності окремого редагувального домену молекули АРСаз з або без попередньої дисоціації міс-ацильованої тРНК. Так в ЛейРСазі, ІлеРСазі та ВалРСазі, що належать до першого класу АРСаз, редагувальний сайт представлений CP1 (connective peptide 1) доменом [21]. Механізм пост-трансферного редагування був досліджений рентгеноструктурним аналізом на прикладі комплексу бактеріальної ЛейРС з міс-ацильованою тРНК. ЛейРС зазнає ряд конформаційних змін, але зберігає взаємодію з молекулою тРНК. При цьому 3'-кінець тРНК безпосередньо переноситься в редагувальний домен, де естерний зв'язок тРНК з амінокислотою підлягає гідролізу [22]. Натомість, деацилювання АРСазами II класу здійснюється після повторного зв'язування попередньо дисоційованої аміноацил-тРНК [23].

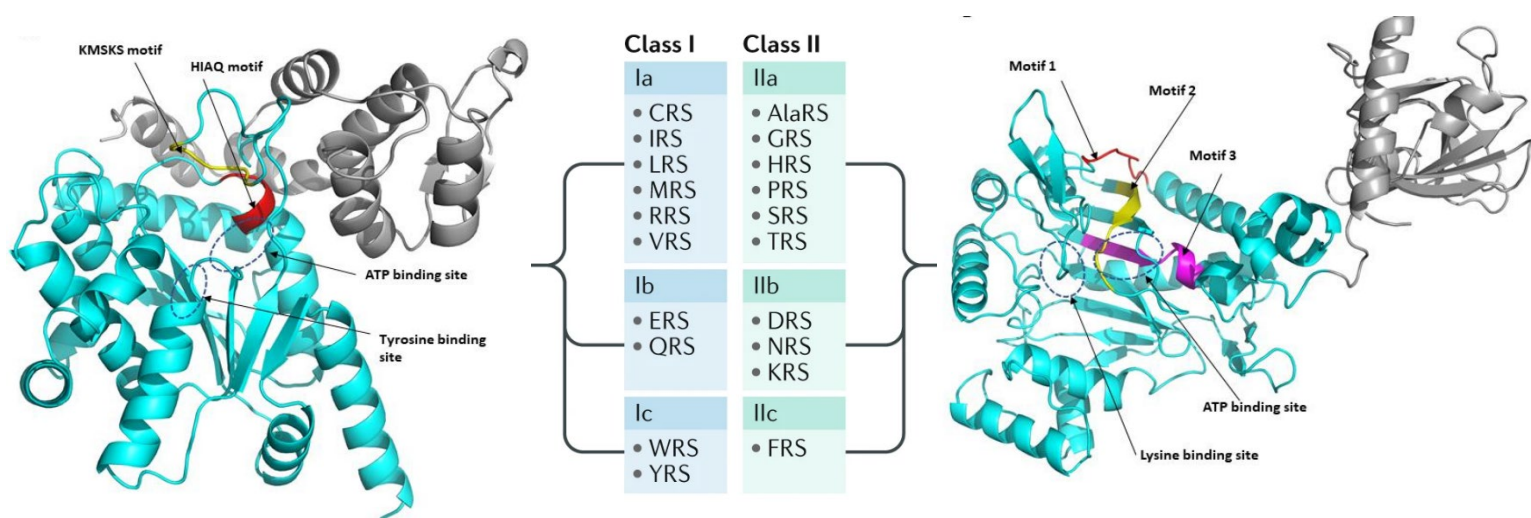


Рисунок 1.1 – Структура активного центру зумовлює розділення АРСаз на I (на прикладі ТирРСази, зліва) та II (на прикладі ЛізРСази, справа) класи. Класи поділяються на підкласи залежно від фізико-хімічних властивостей відповідних споріднених амінокислот [24].

### 1.1.2 Неканонічні функції аміноацил-тРНК синтетаз

Окрім участі в біосинтезі поліпептидного ланцюга, АРСази мають значний інтерактом, що дозволяє їм приймати участь в регуляції ряду інших фізіологічних та патологічних процесів, як-от: клітинного росту, проліферації та апоптозу, канцерогенезу тощо. Тканинно-специфічно відбувається АРСаз-опосередкована регуляція імунної відповіді та ангіогенезу [25,26]. При цьому баланс між канонічною та неканонічною активністю АРСаз може досягатися завдяки їхніх пост-трансляційних модифікацій.

Цікавим прикладом є ЛізРСаз-опосередкована імунна відповідь при активації тучних клітин, що зумовлена біосинтезом алармону Ар4А (діаденозин тетрафосфату) [27,29]. Це відбувається, коли замість перенесення активованої амінокислоти на тРНК, комплекс амінокислота-АМФ вивільняється та взаємодіє з другою молекулою АТФ. Утворений алармон забезпечує апрегулюцію експресії MITF (microphthalmia transcription factor)-залежних генів за рахунок порушення взаємодії MITF з його специфічним інгібітором HINT [28]. Активація MAPK-каскаду в тучних клітинах

призводить до форсфорилування ЛізРСази по залишку Ser207, внаслідок чого відбувається дисоціація синтетази з MSC та її транслокація в ядро. Так молекули Ar4A синтезуються в безпосередній близькості від MITF-HINT комплексу та ефективно сприяють його дисоціації [29].

Дослідження APCаз-опосередкованої регуляції ангіогенезу показали, що мутації мітохондріальної ТриРСази (WARS2) асоційовані зі зниженням життєздатності клітин ендотелію та споживання ними кисню [30]. Також відомі молекулярні засади негативної регуляції ангіогенезу СерРСазою за рахунок зниження транскрипції гену ендотеліального фактору росту судин (VEGF). Каталітичний сайт ензиму здатний взаємодіяти з транскрипційним фактором YY1, в результаті чого утворений комплекс конкурентно інгібує зв'язування активатора NF-κB з цис-регуляторною послідовністю промотора *vegfa* [31].

Канонічна роль APCаз також уможливорює сенсорування внутрішньоклітинної концентрації їхніх споріднених амінокислот для підтримання гомеостазу, що відомо для ГлнРСази, МетРСази та ЛейРСази [32]. Регуляція сигнального каскаду залежно від концентрації глютаміну здійснюється за рахунок ГлнРСаз-опосередкованого інгібування кіназної активності Ask1 [33]. Функція Ask1 полягає в активації (МКК4)/МКК7-JNK та МКК3/МКК6-p38 метаболічних шляхів, які в свою чергу регулюють ряд клітинних відповідей на стресові умови, в тому числі апоптоз та клітинну диференціацію [34]. Сенсорування метіоніну та лейцину здійснюється регулюванням активності mTORC1 метаболічного шляху [35].

### 1.1.3 Метаболічний шлях mTORC1

mTOR (mechanistic target of rapamycin complex або мішень комплексу рапаміцину 1 ссавців) належить до сімейства PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase related kinases). mTOR функціонує в двох різних мультипротеїнних комплексах – mTORC1 та mTORC2 [36].

Головними компонентами mTORC1 є mTOR, його асоційований регуляторний білок Raptor та mLst8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8). Інтеграцію сигналіngu також забезпечують додаткові компоненти комплексу DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein) та PRAS40 (proline rich Akt substrate, 40 kDa) [37]. mTORC1-опосередкований метаболічний шлях інтегрує поза- (цитокіни, фактори росту, гормони) та внутрішньоклітинні (рівень глюкози, АТФ, кисню та амінокислот) сигнали та регулює ряд процесів анаболізму як біосинтез протеїнів і ліпідів [38,39]. mTORC1 стимулює біосинтез білка на транскрипційному (за рахунок активаційного фосфорилування регулятора фактора ініціації 4E-ВР1) та трансляційному (за рахунок активаційного фосфорилування рибосомальних білків, зокрема S6K1) рівнях [40,41].

Активація mTORC1 опосередковується малою ГТФазою Rheb (Ras homolog enriched in brain), С-термінальна частина якої забезпечує її tetherування на лізосомальній мембрані. В ГТФ-зв'язаній формі Rheb здатна взаємодіяти з mTORC1, що алостерично призводить до зміни положення автоінгібувального домену (FAT-clamp) mTOR, а отже індукує його каталітичну функцію [42]. Наразі відомі кілька молекулярних механізмів активації mTORC1 залежно від природи сигнальних молекул. Активація факторами росту зумовлена Akt-опосередкованим інгібувальним фосфорилуванням TSC2 (туберіну) – GAP (GTPase-activating protein) Rheb, що каталізує його перехід в неактивну ГДФ-зв'язану форму [43]. Мас-спектрометричними дослідженнями було встановлено, що протеїногенні амінокислоти лейцин, глутамін та аргінін здатні індукувати активацію mTORC1 з різною кінетикою відповіді [44].

#### **1.1.4 ЛейРС-опосередкована активація mTORC1**

Активація mTORC1 амінокислотами опосередковується гетеродимерами Rag (Ras related GTP binding) ГТФаз: RagA/RagB з RagC/RagD. Активований димер Rag (при ГТФ-зв'язаних RagA/RagB та ГДФ-

зв'язаних RagC/RagD) взаємодіє з мультипротеїнним комплексом Ragulator, який асоційований з лізосомальною мембраною завдяки ацильованому залишку жирної кислоти компонента p18. Одночасно активований Rag рекретує mTORC1. Знаходячись в просторовій близькості до лізосомальної мембрани, mTORC1 взаємодіє з Rheb та активується [45].

Лейцин-залежна активація mTORC1 опосередковується ЛейРСазою, що взаємодіє з RagD та опосередковує  $\text{RagD}^{\text{GTP}}$ - $\text{RagD}^{\text{GDP}}$  перехід, що каталізується фоллікуліном (FLCN) [6,46]. Рентгеноструктурним аналізом результату кокрystalізації ЛейРС з лейцином було показано, що зв'язування амінокислоти призводить до алостеричної зміни положення  $\alpha$ -спіралі swing helix, що з'єднує С-термінальний домен з N-термінальним та центральним доменами ензима. Внаслідок цього стерична доступність RBD домену для взаємодії з RagD збільшується, ЛейРС знаходиться в так званій «sensing on+» конформації (рис. 1.2). Амінокислотний залишок R517 виконує функцію молекулярного важеля для зміни конформації, а тому є ключовим для ЛейРС-опосередкованої активації mTORC1. Натомість, структура комплексу ЛейРС з лейцил-AMS, що мімікрує лейцил-АМФ відповідає сигнально неактивній («sensing off») конформації синтетази [6]. Отже, теоретично кінетика зміни між «sensing on» та «sensing off» конформаціями ЛейРСази має відповідати швидкості реакції активації амінокислоти. Молекулярні та структурні аспекти феномену є актуальними проблемами дослідження ЛейРС-залежної активації mTORC1.

Інтегрований молекулярний механізм регуляції активності Rag є складним та включає ряд GAP, GEF, сенсорних та скефолдних протеїнів (графічно зображено на рис. 1.3). Мультипротеїнний субкомплекс GATOR1 має специфічну GAP активність до RagA і RagB, отже сприяє їхньому переходу в інактивовану ГДФ-зв'язану форму та інгібує mTORC1 [47]. Субкомплекс GATOR2 інгібує активність GATOR1 і в свою чергу регулюється лейцин-зв'язувальним протеїном Sestrin [48,49]. v-ATPase (протон-АТФаза вакуолярного типу) є сенсором концентрації лейцину в люмені лізосоми та

стабілізує Ragulator [50]. Порушення регуляції активності mTORC1 має патологічні наслідки. Зокрема, відомо, що гіперактивація комплексу призводить до канцерогенезу, а підвищення активності асоційоване з ожирінням та цукровим діабетом [51].

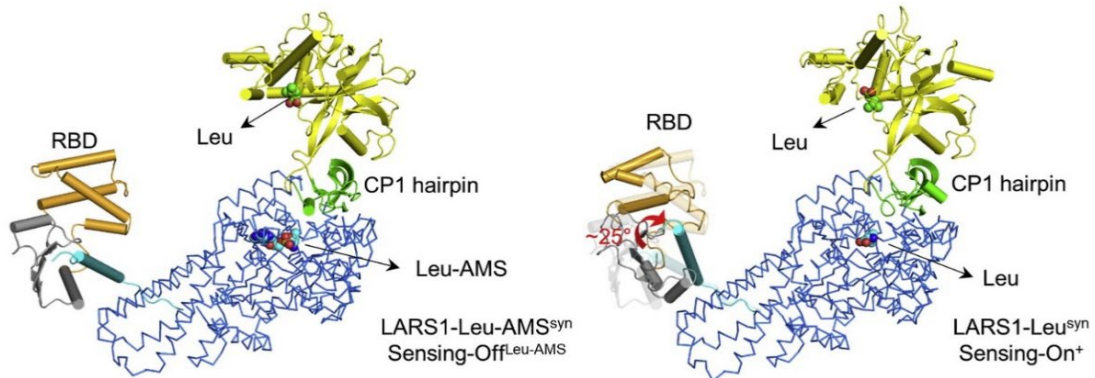


Рисунок 1.2 – Моделі, отримані рентгеноструктурним аналізом комплексів ЛейРСази з лейцил-AMS (зліва) та лейцином (справа) демонструють лейцин-індукований поворот swing helix, що змінює просторову орієнтацію RBD та забезпечує «sensing on+» конформацію [6].

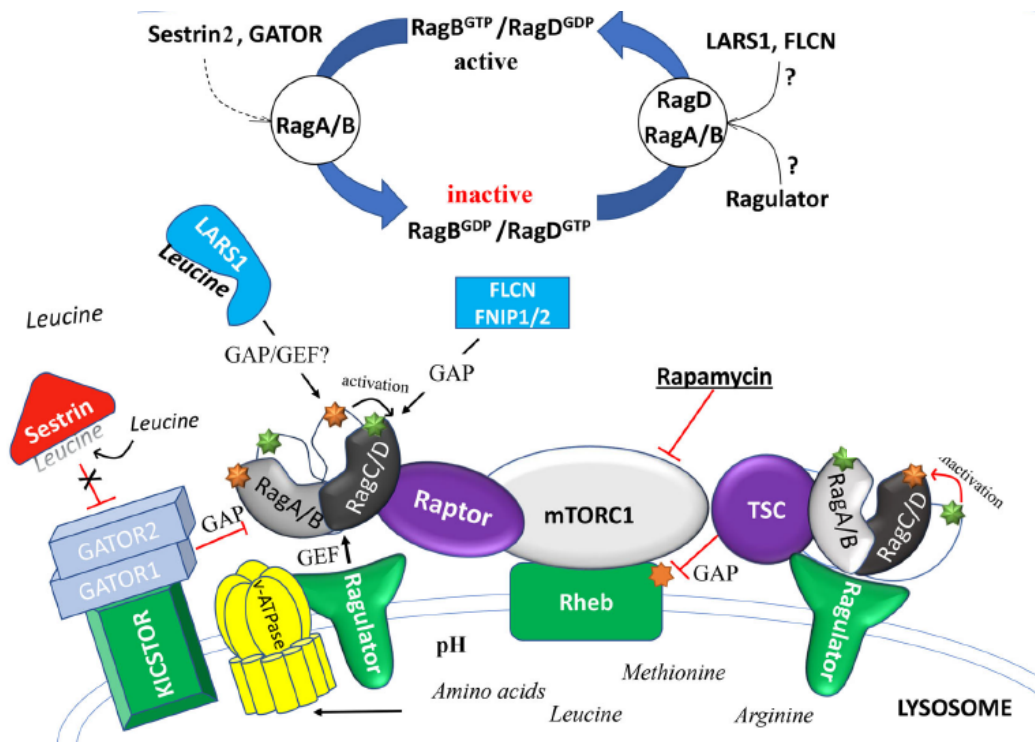


Рисунок 1.3 – Схема ЛейРС-залежної активації mTORC1 (докладно описана в основному тексті) [52].

## 1.2 Хімічні аналоги лейцину

### 1.2.1 Дискримінація субстратів ЛейРСазою

Молекули, хімічна та стерична структура яких є близькою до структури спорідненого субстрату ензиму, часто можуть взаємодіяти з його активним сайтом та зазнавати відповідного каталітичного перетворення [53]. Важливою характеристикою ензимів є фактор дискримінації, що математично виражає їхню специфічність до споріднених субстратів в порівнянні з неспорідненими, враховуючи показники афінності та кінетики каталізу [54]. Така дискримінація субстратів є ключовою властивістю для АРСаз, адже вона попереджає місінкорпорацію в поліпептидний ланцюг аналогів спорідненої амінокислоти та відповідно порушення його фолдингу [55]. *In vitro* дослідження кінетики взаємодії ЛейРС з ізолейцином, норваліном та гомоцистеїном показали, що незважаючи на редагувальну активність синтетази, фактор дискримінації цих амінокислот є нижчим, аніж встановлене порогове значення цитотоксичності [56].

Серед аналогів лейцину найнижчий показник фактора дискримінації характерний для протеїногенного ізолейцину [56].

### 1.2.2 Норвалін

Норвалін є непротеїногенною неполярною амінокислотою, що утворюється в клітинах як побічний продукт метаболічного шляху біосинтезу амінокислот з розгалуженим бічним ланцюгом (ВСАА). Це в першу чергу пояснюється тим, що ензим  $\alpha$ -ізопропілмалат синтаза має відносно низьку субстратну специфічність, тому каталізує трансамінування ряду  $\alpha$ -кетокислот, в тому числі і похідну сполуку пірувата  $\alpha$ -кетобутарат [57].

Дослідження показали, що зниження рівня кисню в середовищі з високою концентрацією глюкози призводять до накопичення норваліну в клітинах *E.coli* внаслідок накопичення продукту гліколізу пірувату [58]. До того ж, окремі харчові продукти та протеїнні добавки містять значну кількість норваліну [59].

### 1.2.3 Гомоцистеїн

Гомоцистеїн є сульфур-вмісною неполярною непротеїногенною амінокислотою, що утворюється внаслідок деметилювання метіоніну в циклі транссульфурування [60]. В нормі елімінація гомоцистеїну в організмі людини відбувається ензимами метилентетрагідрофолат редуктазою (MTHFR) та метіонін синтазою (MS), що каталізують його зворотнє метилювання [61]. Аутосомально-рецесивні мутації цих ензимів призводять до гомоцистеїнемії. З накопиченням гомоцистеїну асоційований ряд патологічних процесів, в тому числі і нейродегенеративних станів, зокрема хвороби Альцгеймера [62].

В дослідженні *Khayati et al.* було показано, що в культурі клітин лінії людських iPSC-похідних нейронів, за відсутності в середовищі лейцину гомоцистеїн здатний активувати mTORC1, імовірно, за ЛейPC-опосередкованим механізмом [63]. Гіперактивація mTORC1 добре пояснює патологічні прояви гомоцистеїнемії, зокрема активацію аутофагії [64]. Встановлення структурних аспектів гомоцистеїн-залежної активації mTORC1 може дати нові ідеї у пошуку мішеней для розробки лікарських засобів проти станів гомоцистеїнемії. До того ж, виникає питання того чи здатні інші аналоги лейцину, включаючи норвалін, до подібної фізіологічної функції. Порушення цих питань призвели до проведення експериментальних досліджень, результатом яких стала дана робота.

## 1.3 Протеїн-ліганд взаємодії

### 1.3.1 Методи дослідження протеїн-ліганд взаємодій

Взаємодія протеїнів з лігандами може призводити до алостеричної зміни їхньої конформації, що в свою чергу є важливим для забезпечення ряду фізіологічних функцій клітини, зокрема експресії генів, регуляції метаболічних та сигнальних шляхів тощо [65]. Розвиток алгоритмів молекулярної динаміки та докінгу значно покращив якість *in silico* передбачень протеїн-ліганд взаємодій. Проте такі методи є дуже затратними з

точки зору часу та комп'ютерної потужності, а також потребують експериментального підтвердження [66].

Кінетичні аспекти протеїн-лігандної взаємодії можливо отримати експериментально за допомогою ряду методів, зокрема ізотермальної калориметрії та аналізу гасіння внутрішньої флуоресценції білка при титруванні. Обидва методи дозволяють розрахувати спорідненість (афінність) ліганду до протеїну, що виражається показником константи дисоціації  $K_d$  (1,2) [67].



$$K_d = \frac{[L] \cdot [P]}{[L \cdot P]} \quad (2)$$

Метод ізотермальної титрувальної калориметрії заснований на точній фіксації зміни температури зразка протеїну внаслідок титрування однакових об'ємів ліганду. Це зумовлено формуванням сукупності слабких взаємодій між лігандом та протеїном. Окрім отримання значень констант дисоціації, метод дозволяє з високою точністю розрахувати ентропійну ( $\Delta G$ ) та ентальпійну ( $\Delta H$ ) складову термодинаміки взаємодії, а також оцінювати її стехіометрію, кооперативність тощо [68].

Калориметричні та спектрофлуориметричні методи детекції протеїн-ліганд взаємодій не дозволяють отримати інформацію про їхню сайт-специфічність. Для цього доцільно користуватися рядом методів структурної біології, наприклад як ЯМР, Гідроген-Дейтерій обмінна мас-спектрометрія (HDX-MS), рентгеноструктурний аналіз та інші. Принцип Н(D)X-MS полягає в спостереженні динаміки обміну амідних гідрогенів в поліпептидному скелеті, що корелює з впорядкованістю протеїну, участі відповідних ділянок в формуванні вторинної та третинної структури, а також доступу молекул розчинника до них. Так як зв'язування ліганду з високою вірогідністю

призводить до зміни цих параметрів на інтерфейсі взаємодії, з достатньо високою точністю можливо визначити сайт-специфічність [69].

ЯМР спектроскопія пропонує ряд режимів вимірювання та аналізу отриманого сигналу для детермінації структурних та кінетичних аспектів протеїн-ліганд взаємодії. Хімічний зсув є надзвичайно чутливим до їхнього хімічного оточення ядер та його зміни [70]. Спектроскопія ядерного ефекту Оверхаузера та J-coupling використовується для моделювання близько- та далеко-векторних алостеричних змін структури [71].

В рентгенструктурному аналізі отримати комплекс протеїн-ліганд можливо при кокрystalізації речовин або ефективним просочуванням вже кристалізованого протеїну розчином ліганду, за умови, що при цьому його структура не порушується [72].

### **1.3.2 Метод моніторингу гасіння внутрішньої флуоресценції протеїну для дослідження протеїн-ліганд взаємодії**

Явище флуоресценції широко використовується в біофізичних дослідженнях, зокрема для вивчення структури протеїнів та їхньої взаємодії з молекулярними партнерами [73,74]. Флуоресценція виникає при поглинанні енергії кванту світла молекулами флуорофорами, внаслідок чого відбувається перехід електронів на збуджений енергетичний рівень. Згідно з діаграмою Яблонські, частина надлишкової енергії розсіюється внаслідок вібраційної релаксації в синглетному стані, а також процесів внутрішньої конверсії [75]. За правилом Каша, тільки з енергетично найнижчого синглетного збудженого стану відбувається флуоресцентна емісія. Отже, через втрату частини енергії довжина хвилі випромінюваного світла завжди є більшою, ніж поглинутого. Важливою характеристичною ознакою флуорофора є показник зсуву між спектрами його поглинання та емісії – зсуву Стокса [76].

Наразі відомо ряд флуоресцентних міток різної природи, які можуть бути приєднані до протеїну пост-трансляційною ковалентною зшивкою (Alexa Fluor Dye, Cyanine Dyes тощо) або транскрипційним злиттям при його

рекомбінантній експресії (GFP, mCherry та інші) [77,78]. Незважаючи на ефективність використання флуоресцентних міток, головним недоліком методу є ризик індукованого ними порушення нативної структури макромолекули [79].

Ароматичні амінокислоти протеїнів забезпечують їхню природню або внутрішню флуоресценцію внаслідок здатності бокових ланцюгів до фотон-вимушеного  $\pi$ - $\pi^*$  переходу та подальшої релаксації з емісією фотонів світла [80]. При цьому найбільший вклад в квантовий вихід флуоресценції протеїну забезпечує індольне кільце триптофану з характеристичним поглинанням довжини хвилі  $\sim 280$  нм та емісією в  $\sim 350$  нм [81]. Квантовий вихід, зумовлений залишками фенілаланіну та тирозину в протеїні, зазвичай гаситься через явище FRET (Fluorescence resonance energy transfer) на триптофан або поліпептидний ланцюг [82].

Інтенсивність емісії, а також максимальна довжина хвилі випромінювання триптофанової флуоресценції залежить від хімічного оточення амінокислоти, а саме його полярності, участі в формуванні вторинної та третинної структури, доступності для розчинника тощо [83]. Зміна довжини хвилі, якій відповідає максимум емісії, спостерігається при значних змінах його структури, зокрема денатурації (в цьому випадку відбувається зсув піку в напрямку червоного діапазону). Взаємодія ліганду з протеїном в близькості до триптофанових залишків сприяє їхній безвипромінювальній релаксації (переносу енергії збудження на молекулу ліганду). Отже, при титруванні протеїну лігандом поступово знижується інтенсивність його внутрішньої флуоресценції, а отже, є явищем динамічного гасіння флуоресценції. Кінетика цього процесу описується за рівнянням Штерна-Вольмера (3) [84,85]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} * [Q] \quad (3)$$

де  $I_0$  – інтенсивність внутрішньої флуоресценції до початку титрування,  $I$  – інтенсивність внутрішньої флуоресценції після додавання певної концентрації

ліганду,  $[Q]$  – відповідна коцентрація гасника (ліганду),  $K_{SV}$  – константа Штерна-Вольмера.

Статичне гасіння флуоресценції відрізняється від динамічного тим, що виникає при формуванні нефлуоресцентного комплексу ліганд-білок. Проте загалом опис кінетики процесу та формула обчислення константи Штерна-Вольмера аналогічні до таких при динамічному гасінні [86].

Константа Штерна-Вольмера математично пов'язана з константою дисоціації. Проте, при розрахунках результатів аналізу гасіння флуоресценції потрібно враховувати ряд факторів, що впливають на інтенсивність емісії, а саме коректувати сигнал флуоресценції на величину абсорбції та розсіяння при довжині хвилі емісії [87]. Також при титруванні зразок протеїну розводиться, через що виникає корекційний фактор розведення. Для точного отримання значення константи Штерна-Вольмера графік залежності  $\frac{I_0}{I}$  від концентрації графіку лінеаризують. Неможливість лінійної апроксимації навіть при невеликих значеннях  $\frac{I_0}{I}$  може свідчити про негативну або позитивну кооперативність зв'язування ліганду, а саме приєднання однієї молекули ліганду відповідно знижує або збільшує афінність приєднання другої молекули. У цьому випадку проводиться поліноміальна апроксимація та розраховуються значення констант Штерна-Вольмера різних порядків [88].

## РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

### 2.1 Реактиви та розчини

У роботі було використано наступні реактиви та розчини:

а. Бактеріальні поживні середовища:

- 2x TY-середовище: триптон 16 г/л, дріжджовий екстракт 10 г/л, NaCl 5 г/л;

б. Буферні розчини:

Афінна хроматографія:

- буфер А1: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 40 mM PBS (pH 7.9), 5 mM імідазол, 0.3 mM NaCl, 2 mM  $\beta$ -меркаптоетанол;
- буфер А2: буфер А1 з 0.5 M NaCl та 15 mM імідазолу;
- буфер В: буфер А1 з 250 mM імідазолу;

Діаліз:

- буфер С: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM  $\beta$ -меркаптоетанол;

Іоннообмінна хроматографія:

- буфер С;
- буфер для елюції: буфер С з градієнтним вмістом 0 – 400 mM NaCl;

Гель-фільтрація:

- буфер D: 25 mM HEPES 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>;

Спектрофлуориметричний аналіз:

- 100 mM HEPES, 15 mM KCl, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT.

### 2.2 Рекombінатна експресія, виділення та очищення ЛейРСази

Рекombінатна експресія ЛейРСази людини проводилася в клітинах *E.coli* штаму Rosetta, трансформованих плазмідним конструктом з послідовністю ЛейРСази з полі-His тегом. Культивування проводилося у 2xTY середовищі з 0.4 mM IPTG при температурі +18 °C протягом ночі. Клітини були ресуспендовані в буфері А1 з додаванням 1 mM PMSF, 1 таблетки коктейлю інгібіторів протеаз та 50 мг лізоциму (лізис-буфер). Суспензія інкубувалася на

льоді протягом 30 хвилин, після чого була проведена сонікація та центрифугування (за температури 4°C при 21 000\*g протягом 1 години).

Отриманий лізат інкубували з попередньо врівноваженою буфером A1 Ni-NTA-агарозою протягом 1 години з помірним перемішуванням, після чого суспензію послідовно промивали 15-кратними об'ємами буферів A1 та A2. Елюцію проводили концентрацією імідазолу 250 мМ. Цей етап і всі подальші проводились при температурі 4°C.

Фракції, які містили білок, що було виміряно спектрофотометрично, були діалізовані проти буфера С протягом ночі для позбавлення імідазолу.

Аніонообмінна хроматографія діалізованого білка здійснювалася за допомогою DEAE-сефарози, попередньо врівноваженої буфером С. Білковий препарат наносився на колонку, після чого проводилась елюція у градієнті 0-400 мМ NaCl-вмісного буферу С. Фракції, які містили цільовий білок, детектували спектрофотометрично та за допомогою 10% SDS-PAGE. Обрані фракції, що містили ЛейРС, в подальшому концентрувалися центрифугуванням в Thermo Scientific Pierce Protein Concentrators PES (30 MWCO).

Гель-фільтрація проводилася на попередньо еквіліброваній HiLoad 16/60 Superdex 200 колонці з буфером D. Чистоту білкових фракцій було оцінено на 10% SDS-PAGE. Фракції з білком були концентровані центрифугуванням, як і на попередньому етапі. Концентрація фінального препарату рекомбінантної ЛейРС людини склала 33.8 μМ.

### **2.3 Спектрофлуориметрія**

В дослідженні був використаний спектрофлуориметр Jasco FP-8200. Очищена людська ЛейРСаза була розведена відповідним буфером до фінальної концентрації 125 нМ (загальний об'єм зразка 200 мкл). Кювета попередньо промивалася водою та буфером. Експериментальні параметри налаштування спектрофлуориметра наведені в Таблиці 2.1.

Перед початком кожного титрування було виміряно  $I_0$  до встановлення стабільного значення. Для титрування використовувалися 100 мМ розчини лігандів (окрім, дослідження зв'язування L- та D-норваліну і L- та D-гомоцистеїну в першому реплікаті). Титрування проводилася в двох-порядковій манері: по 0.1 мкл титранту на крок до загального об'єму 1 мкл, після чого по 1  $\mu$ л до загального об'єму 5 або 10 мкл (залежно від темпів гасіння флуоресценції).

В експериментах зв'язування амінокислот попередня інкубація синтетази з АТФ або АТФ $\alpha$ S проводилася в кюветі з 1мМ концентрацією відповідного ліганда при температурі 37 °С (оптимальна для людської синтетази) протягом 10 хвилин.

Негативний контроль був встановлений титруванням аналогічного об'єму буферу в зразок ЛейРСази.

Спектрофотометрично було отримано спектр поглинання протеїну в нативному та денатурованому стані (в 6М сечовині) в діапазоні 190-350 нм для отримання коефіцієнтів розсіювальної корекції емісії, а також контролю концентрації ЛейРСази.

Таблиця 2.1 – Експериментальні налаштування спектрофлуориметра

Довжина хвилі збудження ( $\lambda_{Exc}$ ), нм	295
Діапазон вимірювання емісії, нм	300-450
Ширина смуг збудження та емісії, нм	2.5
Час відповіді, с	2
РМТ напруга, В	600
Швидкість сканування, нм/хв	200
Джерело світла	Хе лампа 150 Вт
Температура комірки зі зразком, °С	37

## 2.4 Аналіз результатів спектрофлуориметрії

Розсіювальний фактор корекції був обчислений та врахований в інтенсивності емісії за наступними формулами(4, 5).

$$C_{scat.} = \frac{1-10^{-A_{280}}}{2.303*A_{280}} \quad (4)$$

$$I_{corr} = \frac{I}{C_{scat}*C_d} \quad (5)$$

де  $C_{scat.}$  – розсіювальний фактор корекції,  $C_d$  – фактор корекції розведення,  $I$  – інтенсивність емісії вимірювання,  $A_{280}$  – величина абсорбції при 280 нм.

Для обчислень були використані значення інтенсивності емісії, що відповідали максимуму спектру. В наших експериментах величина  $\lambda_{max.em}$  варіювалася в діапазоні 338-340 нм. При цьому зсуву положення максимуму спектру в межах одного експерименту титрування зафіксовано не було. Коректовані значення інтенсивності емісії при кожному додаванні ліганду ділилися на коректовану початкову інтенсивність. Від отриманих значень віднімалися значення  $\frac{I_0}{I}$  додавання буферу відповідного об'єму (негативний контроль).

Графіки залежності  $\frac{I_0}{I}$  від концентрації були побудовані та лінеаризовані в RStudio. З рівнянь апроксимації була розрахована концентрація, при якій спостерігалася гасіння флуоресценції вдвічі (аналог  $K_{SV}$ ). Значення  $K_D$  надалі розраховувалися за формулою (6):

$$K_D = \left[ L_{\frac{1}{2}} \right] - \frac{[P]}{2} \quad (6),$$

де  $\left[ L_{\frac{1}{2}} \right]$  – розрахована з рівняння лінеаризації концентрація ліганду, при якому спостерігалася гасіння інтенсивності в 2 рази,  $[P]$  – концентрація протеїну.

Для більшості лігандів спостерігалася насичення при титруванні 1 мікромолю титруванню. Тоді за умови, що точка  $\frac{I_0}{I} = 2$  була досягнена в межах

лінійного діапазону ( $R^2 > 0.9$ ), обчислення констант Штерна-Вольмера проводилися по ньому.

Технічні реплікати були проведені для титрувань L-норваліном, L-гомоцистеїном, а також вимірювань з попередньою інкубацією з АТФ та АТФ $\alpha$ S.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1 Дослідження взаємодії L- і D-лейцину та його непротеїногенних аналогів з ЛейРСазою

Вивчення структурних аспектів сигнальних ЛейРС-опосередкованих функцій непротеїногенних аналогів лейцину потребує попереднього кінетичного аналізу їхнього зв'язування. Для підтвердження факту взаємодії ми проводили експерименти титрування природніх L-варіантів спорідненої амінокислоти лейцину та його непротеїногенних аналогів норваліну та гомоцистеїну в попередньо очищену ЛейРСазу.

Оброблені результати гасіння флуоресценції, демонструють поступове насичення синтетази субстратами, особливо помітне для L-лейцину. Аналізом лінійної частини графіку були отримані значення констант дисоціації. В досліджуваному діапазоні концентрацій і норвалін, і гомоцистеїн здатні до взаємодії з ЛейРСазою з афінністю аналогічного ступеню, що і лейцин (рис. 3.1, табл. 3.1). Фізіологічно концентрація лейцину в клітині є значно більшою, ніж норваліну та гомоцистеїну. Взаємодія з ЛейРСазою може пояснити патологічні наслідки стану гомоцистеїнемії та норвалінемії [55,60].

Наступною серією експериментів було титрування D-стереоізомерами амінокислот. Так як гомохіральність амінокислот забезпечує нормальний фолдинг та функціональність протеїнів, дискримінація аміноацил-тРНК синтетазами D-амінокислот є надзвичайно важливою властивістю. Проте, попередні дослідження АлаРСази (яка належить до II класу) *T. thermophilus* демонструють, що дискримінація не є абсолютною, адже D-аланін взаємодіє з протеїном, хоч і з меншою афінністю [89]. Отримані нами результати показали зв'язування D-лейцину та його аналогів з ЛейРСазою з константами дисоціації в 2.7 (лейцин), 4.5 (норвалін) та 7.5 (гомоцистеїн) разів більшими, ніж для L-стереоізомерів (рис. 3.2, табл. 3.1)

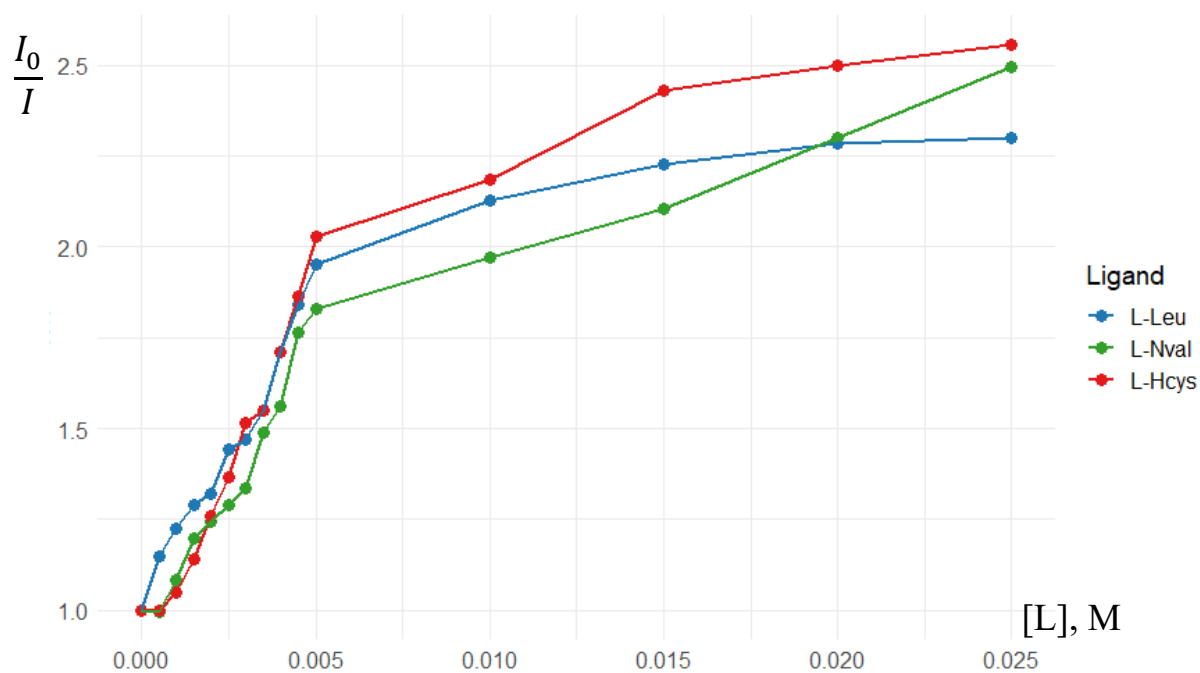


Рисунок 3.1 – Гасіння внутрішньої флуоресценції ЛейРСази L-лейцином (синій), L-норваліном (зелений) та L-гомоцистеїном (червоний).

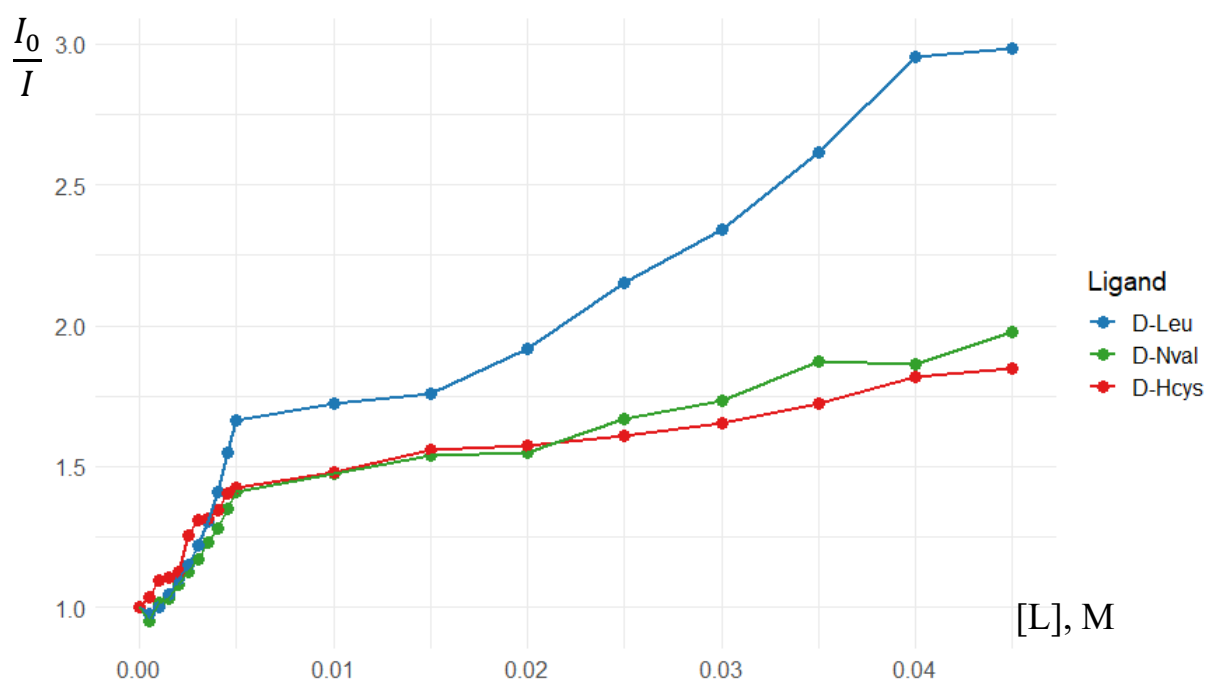


Рисунок 3.2 – Гасіння внутрішньої флуоресценції ЛейРСази D-лейцином (синій), D-норваліном (зелений) та D-гомоцистеїном (червоний)

Таблиця 3.1 – Значення констант дисоціації, отриманих з відповідних лінеаризацій графіків гасіння внутрішньої флуоресценції ЛейРСази.

Ліганд	$K_D, \mu M$
L-лейцин	720
L-гомоцистеїн	694
L-норвалін	861
D-лейцин	1950
D-гомоцистеїн	5300
D-норвалін	3870

### 3.2 Дослідження взаємодії АТФ та АТФ $\alpha$ S з ЛейРСазою

Як було зазначено раніше, зв'язування АТФ з ЛейРСазою є необхідною умовою для активації лейцину, а також mTORC1-сигналіngu. Проте, швидкий пірофосфатний гідроліз АТФ ускладнює структурні дослідження проміжних змін конформації комплексу рядом методів, зокрема рентгеноструктурним аналізом, кріо-електронною мікроскопією тощо. Вирішення цієї проблеми можливе використовуючи АТФ $\alpha$ S, що відрізняється від природного АТФ своєю нездатністю до гідролізу за рахунок тіоефірного зв'язку. Отже, АТФ $\alpha$ S ймовірно може формувати стабільні потрійні комплекси з ЛейРСазою та лейцином. Перед проведенням структурних досліджень ми хотіли упевнитися, що АТФ $\alpha$ S здатний до взаємодії з синтетазою та не перешкоджає зв'язуванню амінокислот.

Результати гасіння флуоресценції ЛейРСази показали зв'язування як природньої, так і некаталітичної АТФ $\alpha$ S (рис. 3.3). Обчислені значення константи дисоціації для АТФ $\alpha$ S є в 1.7 разі більшими аніж для АТФ, що означає менш ефективну взаємодію (рис. 3.3). Проте більш важливим та цікавим для нас є структурні наслідки зв'язування АТФ $\alpha$ S та вплив на

ефективність взаємодії з амінокислотами. Для цього ми проводили ряд наступних експериментів.

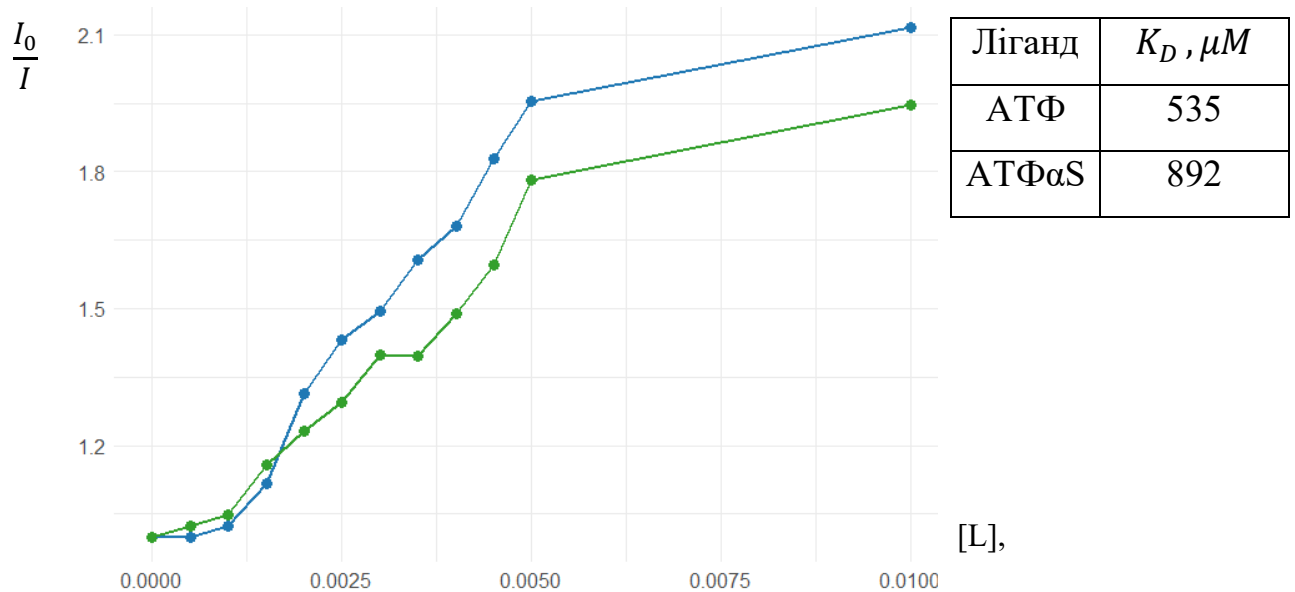


Рисунок 3.3 – Гасіння внутрішньої флуоресценції ЛейРСази АТФ (синій), АТФ $\alpha$ S (зелений) та відповідні значення констант дисоціації

### 3.3 Дослідження впливу попередньо інкубації ЛейРСази з АТФ та АТФ $\alpha$ S на зв'язування L-лейцину

Попередня 10-хвилинна інкубація ЛейРСази з АТФ призводить до більш ефективного гасіння флуоресценції синтетази, а отже зменшення значень константи дисоціації приблизно в 1.5 рази (рис. 3.4). Таким чином, взаємодія з АТФ в концентраціях співрозмірних з фізіологічно існуючими в клітині, полегшує приєднання лейцину і відповідно утворення потрійного комплексу. Як було попередньо зазначено, формування комплексу ЛейРС-лейцин-АТФ, необхідно не тільки для активації лейцину, а також для активації mTORC1.

Цікаво, що попередня інкубація з АТФ $\alpha$ S також значно полегшує приєднання L-лейцину (рис. 3.4). Близькість значень констант дисоціації може бути інтерпретована здатністю АТФ $\alpha$ S індукувати аналогічні конформаційні зміни ЛейРСази, що і природня АТФ. Цей висновок потребує подальшого

експериментального підтвердження з застосуванням альтернативних підходів. Проте отримані нами результати свідчать про доцільність подальшої роботи з АТФ $\alpha$ S для мімікрування впливу природної АТФ на конформацію ЛейРСазі.

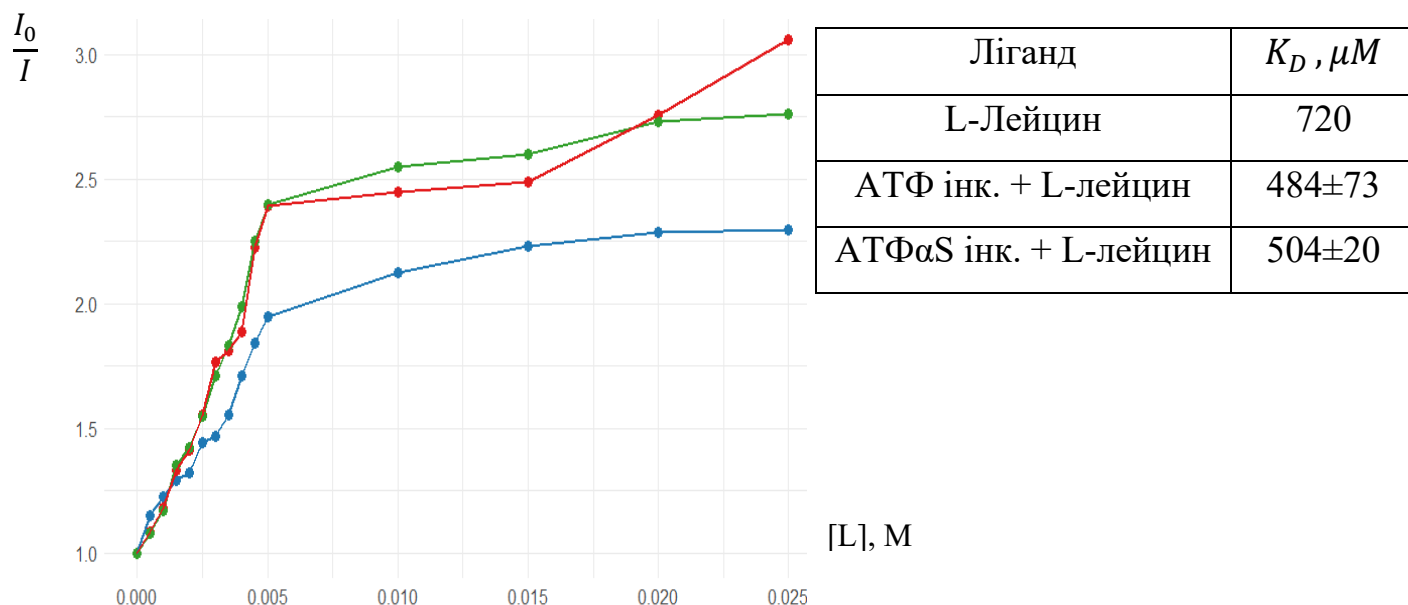
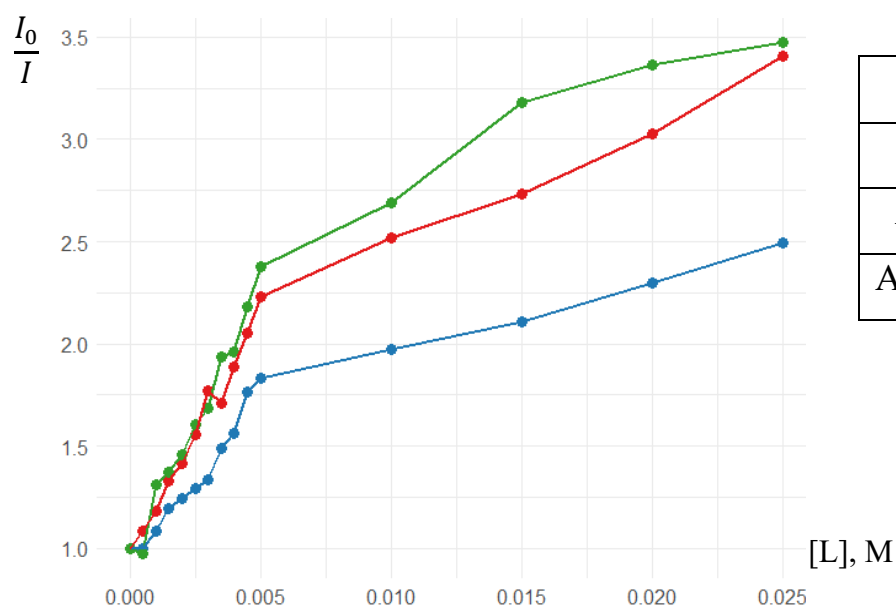


Рисунок 3.4 – Гасіння внутрішньої флуоресценції ЛейРСазі L-лейцином (синій), L-лейцином після інкубації з АТФ (зелений) та АТФ $\alpha$ S (червоний).

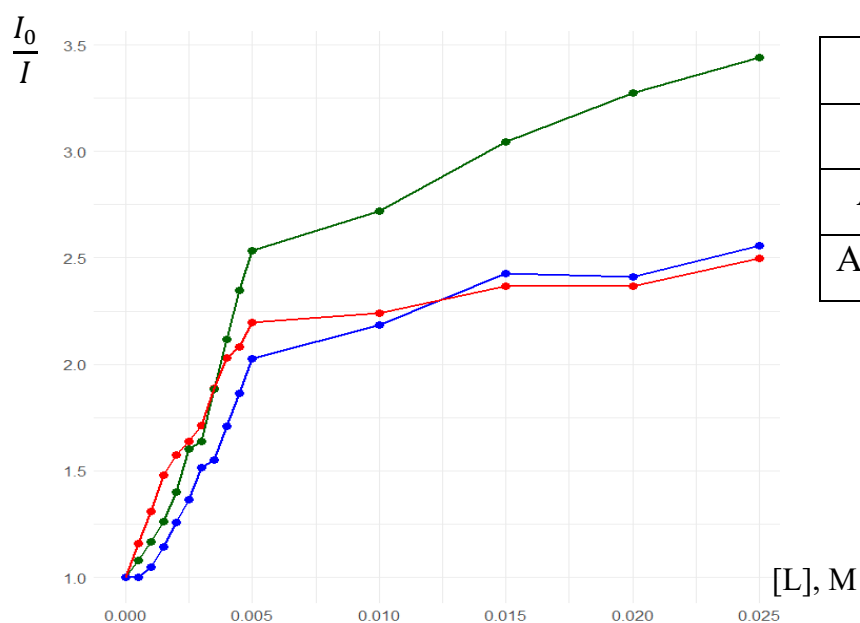
### 3.4 Дослідження впливу попередньо інкубації ЛейРСазі з АТФ та АТФ $\alpha$ S на зв'язування L-гомоцистеїну та L-норваліну

Попередня інкубація ЛейРСазі з АТФ в 1 мМ концентрації збільшує ефективність зв'язування L-норваліну та L-гомоцистеїну в  $\sim 1.8$  та  $\sim 1.65$  рази до значень, співвідносних з відповідними для лейцину (рис.3.5, 3.6). Наші результати підтверджують, що зв'язування непротеїногенних аналогів лейцину з ЛейРСазі є АТФ-залежним процесом, що відповідає попередньо ідентифікованому явищу їхньої міс-активації та міс-інкорпорації в поліпептидний ланцюг.



Ліганд	$K_D, \mu M$
L-Норвалін	861 $\pm$ 175
АТФ інк. + L-норвалін	490 $\pm$ 70
АТФ $\alpha$ S інк. + L-норвалін	424 $\pm$ 47

Рисунок 3.5 – Гасіння внутрішньої флуоресценції ЛейРСази L-норваліном (синій), L-норваліном після інкубації з АТФ (зелений) та АТФ $\alpha$ S (червоний).



Ліганд	$K_D, \mu M$
L-Гомоцистеїн	694 $\pm$ 12
АТФ інк. +L- гомоцистеїн	422 $\pm$ 13
АТФ $\alpha$ S інк. + L-гомоцистеїн	399

Рисунок 3.6 – Гасіння внутрішньої флуоресценції ЛейРСази L-гомоцистеїном (синій), L-гомоцистеїном після інкубації з АТФ (зелений) та АТФ $\alpha$ S (червоний).

Некаталітичний АТФ $\alpha$ S також показав властивість сприяти зв'язуванню L-гомоцистеїну та L-норваліну (рис. 3.5, 3.6). Як і у випадку L-лейцину, значення констант дисоціації є близьким до значень констант, отриманих з АТФ-інкубацією. Незважаючи на обмежену інформативність спектрофлуориметричного методу, гіпотетично, у випадку докорінно відмінної зміни конформації ЛейРСазі в результаті взаємодії з АТФ $\alpha$ S, очікувано було б побачити статистично велику різницю з АТФ-індукованим покращенням зв'язування лейцину. Таким чином, наші результати не свідчать про порушення АТФ $\alpha$ S структури ЛейРСазі щонайменше в її каталітичному сайті.

Загалом, кінетика та параметри взаємодії L-норваліну та L-гомоцистеїну з ЛейРСазою не суперечать гіпотезі про їхню здатність приймати участь у mTORC1 сигналіngu за механізмом, аналогічним до лейцин-індукованого. Проте для остаточного доказу цього факту доцільним є використання методів структурної біології, що здатні підтвердити сайт-специфічність взаємодії.

## ВИСНОВКИ

Ми використали аналіз гасіння внутрішньої флуоресценції людської ЛейРСази для дослідження її *in vitro* взаємодії з неспорідненими амінокислотами норваліном та гомоцистеїном та дослідити вплив попередньої інкубації протеїну АТФ та АТФ $\alpha$ S на ефективність взаємодії.

1. L-гомоцистеїн та L-норвалін продемонстрували здатність гасити внутрішню флуоресценцію синтетази. При тому в досліджуваному діапазоні концентрацій значення констант дисоціації мали такий самий порядок, що і лейцин. Значно менш ефективно зв'язування було продемонстровано для D-стереоізомерів, що є очікуваним результатом враховуючи стереоспецифічність АРСаз до L-амінокислот.

2. АТФ та АТФ $\alpha$ S також продемонстрували взаємодію з ЛейРСазою. При цьому, некаталітичний АТФ $\alpha$ S мав нижчу афінність до протеїну, ніж природний аналог. Тим не менш, попередня 10-хвилинна інкубація показала, що обидві речовини проявляють позитивний вплив на ефективність зв'язування трьох досліджуваних амінокислот з синтетазою. Отримані результати були відтворювані. Отже, спектрофлуориметричний аналіз не свідчить про АТФ $\alpha$ S-індуковану зміну конформації ЛейРСази, що порушує амінокислото-зв'язувальну функціональність її каталітичного сайту. Таким чином, використання АТФ $\alpha$ S для дослідження структури стабільного аналога задіяного в сигналінгу комплексу ЛейРСаза-амінокислота-АТФ наразі видається доцільним.

3. Значення афінності L-гомоцистеїну та L-норваліну після інкубації ЛейРСази з АТФ та АТФ $\alpha$ S були близькими або вищими, ніж L-лейцину. Це, в свою чергу, може свідчити про лейцин-подібну властивість гомоцистеїну та норваліну індукувати активацію mTORC1. Отже, подальші

дослідження з використанням альтернативних методів для підтвердження кінетики (ізотермальна калориметрія, плазмонний поверхневий резонанс тощо) та детермінації структурних аспектів взаємодії норваліну та гомоцистеїну з ЛейРСазою (ЯМР, рентгеноструктурний аналіз, методи молекулярної динаміки тощо) є перспективним напрямком поглиблення знань про регуляцію mTORC1 шляху.

## СПИСОК ВИКОСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Liu, R. J., Long, T., Li, H., Zhao, J., Li, J., Wang, M., Palencia, A., Lin, J., Cusack, S., & Wang, E. D. (2020). Molecular basis of the multifaceted functions of human leucyl-tRNA synthetase in protein synthesis and beyond. *Nucleic acids research*, 48(9), 4946–4959. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa189>
2. Pang, Y. L., & Martinis, S. A. (2009). A paradigm shift for the amino acid editing mechanism of human cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 48(38), 8958–8964. <https://doi.org/10.1021/bi901111y>
3. Clarke, R., Halsey, J., Bennett, D., & Lewington, S. (2011). Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9235-y>
4. Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in cell biology*, 24(7), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.003>
5. Kim, L. C., Cook, R. S., & Chen, J. (2017). mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 36(16), 2191–2201. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.363>
6. Kim, S., Yoon, I., Son, J., Park, J., Kim, K., Lee, J. H., Park, S. Y., Kang, B. S., Han, J. M., Hwang, K. Y., & Kim, S. (2021). Leucine-sensing mechanism of leucyl-tRNA synthetase 1 for mTORC1 activation. *Cell reports*, 35(4), 109031. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109031>
7. Vacek, T. P., Vacek, J. C., Tyagi, N., & Tyagi, S. C. (2012). Autophagy and heart failure: a possible role for homocysteine. *Cell biochemistry and biophysics*, 62(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9281-6>
8. Antonellis, A., & Green, E. D. (2008). The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, 87–107. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164204>

9. Jakubowski H. (2016). Aminoacyl-tRNA synthetases and the evolution of coded peptide synthesis: the Thioester World. *FEBS letters*, 590(4), 469–481. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12085>
10. Novelli G. D. (1967). Amino acid activation for protein synthesis. *Annual review of biochemistry*, 36, 449–484. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.36.070167.002313>
11. Sheppard, K., Yuan, J., Hohn, M. J., Jester, B., Devine, K. M., & Söll, D. (2008). From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic acids research*, 36(6), 1813–1825. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn015>
12. Andersen, G. R., Nissen, P., & Nyborg, J. (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in biochemical sciences*, 28(8), 434–441. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00162-2)
13. Meyer-Schuman, R., & Antonellis, A. (2017). Emerging mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetase mutations in recessive and dominant human disease. *Human molecular genetics*, 26(R2), R114–R127. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx231>
14. Hyeon, D. Y., Kim, J. H., Ahn, T. J., Cho, Y., Hwang, D., & Kim, S. (2019). Evolution of the multi-tRNA synthetase complex and its role in cancer. *The Journal of biological chemistry*, 294(14), 5340–5351. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002958>
15. Fourmy, D., Mechulam, Y., & Blanquet, S. (1995). Crucial role of an idiosyncratic insertion in the Rossman fold of class 1 aminoacyl-tRNA synthetases: the case of methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 34(48), 15681–15688. <https://doi.org/10.1021/bi00048a012>
16. Cusack, S., Härtlein, M., & Leberman, R. (1991). Sequence, structural and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic acids research*, 19(13), 3489–3498. <https://doi.org/10.1093/nar/19.13.3489>

17. Smith, T. F., & Hartman, H. (2015). The evolution of Class II Aminoacyl-tRNA synthetases and the first code. *FEBS letters*, 589(23), 3499–3507. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.006>
18. Yadavalli, S. S., & Ibba, M. (2013). Selection of tRNA charging quality control mechanisms that increase mistranslation of the genetic code. *Nucleic acids research*, 41(2), 1104–1112. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1240>
19. Pang, Y. L., Poruri, K., & Martinis, S. A. (2014). tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 5(4), 461–480. <https://doi.org/10.1002/wrna.1224>
20. Dulic, M., Cvetic, N., Perona, J. J., & Gruic-Sovulj, I. (2010). Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *The Journal of biological chemistry*, 285(31), 23799–23809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.133553>
21. Ye, Q., Wang, M., Fang, Z. P., Ruan, Z. R., Ji, Q. Q., Zhou, X. L., & Wang, E. D. (2015). Degenerate connective polypeptide 1 (CP1) domain from human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase. *The Journal of biological chemistry*, 290(40), 24391–24402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672824>
22. Zhou, X. L., Du, D. H., Tan, M., Lei, H. Y., Ruan, L. L., Eriani, G., & Wang, E. D. (2011). Role of tRNA amino acid-accepting end in aminoacylation and its quality control. *Nucleic acids research*, 39(20), 8857–8868. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr595>
23. Cvetic, N., Perona, J. J., & Gruic-Sovulj, I. (2012). Kinetic partitioning between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases occurs at both pre-transfer and post-transfer hydrolytic steps. *The Journal of biological chemistry*, 287(30), 25381–25394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.372151>
24. Kwon, N. H., Fox, P. L., & Kim, S. (2019). Aminoacyl-tRNA synthetases as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(8), 629–650. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0026-3>

25. Ivanov, K. A., Moor, N. A., & Lavrik, O. I. (2000). Non-canonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry. Biokhimiia*, 65(8), 888–897.
26. Nie, A., Sun, B., Fu, Z., & Yu, D. (2019). Roles of aminoacyl-tRNA synthetases in immune regulation and immune diseases. *Cell death & disease*, 10(12), 901. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2145-5>
27. Zegarra, V., Mais, C. N., Freitag, J., & Bange, G. (2023). The mysterious diadenosine tetraphosphate (AP4A). *microLife*, 4, uqad016. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqad016>
28. Yannay-Cohen, N., Carmi-Levy, I., Kay, G., Yang, C. M., Han, J. M., Kemeny, D. M., Kim, S., Nechushtan, H., & Razin, E. (2009). LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Molecular cell*, 34(5), 603–611. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.019>
29. Guo, Y., Ollé, L., Proaño-Pérez, E., Aparicio, C., Guerrero, M., Muñoz-Cano, R., & Martín, M. (2023). MRGPRX2 signaling involves the Lysyl-tRNA synthetase and MITF pathway. *Frontiers in immunology*, 14, 1154108. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1154108>
30. Wang, M., Sips, P., Khin, E., Rotival, M., Sun, X., Ahmed, R., Widjaja, A. A., Schafer, S., Yusoff, P., Choksi, P. K., Ko, N. S., Singh, M. K., Epstein, D., Guan, Y., Houštěk, J., Mracek, T., Nuskova, H., Mikell, B., Tan, J., Pesce, F., ... Cook, S. A. (2016). Wars2 is a determinant of angiogenesis. *Nature communications*, 7, 12061. <https://doi.org/10.1038/ncomms12061>
31. Shi, Y., Liu, Z., Zhang, Q., Vallee, I., Mo, Z., Kishi, S., & Yang, X. L. (2020). Phosphorylation of seryl-tRNA synthetase by ATM/ATR is essential for hypoxia-induced angiogenesis. *PLoS biology*, 18(12), e3000991. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000991>
32. Lushchak, O., Strilbytska, O. M., Yurkevych, I., Vaiserman, A. M., & Storey, K. B. (2019). Implications of amino acid sensing and dietary protein to the aging process. *Experimental gerontology*, 115, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.11.021>

33. Yu, Y. C., Han, J. M., & Kim, S. (2021). Aminoacyl-tRNA synthetases and amino acid signaling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(1), 118889. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118889>
34. Abdel-Magid A. F. (2018). ASK1: A Therapeutic Target for the Treatment of Multiple Diseases. *ACS medicinal chemistry letters*, 10(1), 12–13. <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.8b00621>
35. Shimobayashi, M., & Hall, M. N. (2016). Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell research*, 26(1), 7–20. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.146>
36. Zarogoulidis, P., Lampaki, S., Turner, J. F., Huang, H., Kakolyris, S., Syrigos, K., & Zarogoulidis, K. (2014). mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review (Review). *Oncology letters*, 8(6), 2367–2370. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2608>
37. Zheng, X., Liang, Y., He, Q., Yao, R., Bao, W., Bao, L., Wang, Y., & Wang, Z. (2014). Current models of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation by growth factors and amino acids. *International journal of molecular sciences*, 15(11), 20753–20769. <https://doi.org/10.3390/ijms151120753>
38. Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
39. Popova, N. V., & Jücker, M. (2021). The Role of mTOR Signaling as a Therapeutic Target in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1743. <https://doi.org/10.3390/ijms22041743>
40. Böhm, R., Imseng, S., Jakob, R. P., Hall, M. N., Maier, T., & Hiller, S. (2021). The dynamic mechanism of 4E-BP1 recognition and phosphorylation by mTORC1. *Molecular cell*, 81(11), 2403–2416.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.031>
41. Iadevaia, V., Huo, Y., Zhang, Z., Foster, L. J., & Proud, C. G. (2012). Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome

- biogenesis and protein synthesis. *Biochemical Society transactions*, 40(1), 168–172. <https://doi.org/10.1042/BST20110682>
42. Yang, H., Jiang, X., Li, B., Yang, H. J., Miller, M., Yang, A., Dhar, A., & Pavletich, N. P. (2017). Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*, 552(7685), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature25023>
43. Bond P. (2016). Regulation of mTORC1 by growth factors, energy status, amino acids and mechanical stimuli at a glance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 13, 8. <https://doi.org/10.1186/s12970-016-0118-y>
44. Meng, D., Yang, Q., Wang, H., Melick, C. H., Navlani, R., Frank, A. R., & Jewell, J. L. (2020). Glutamine and asparagine activate mTORC1 independently of Rag GTPases. *The Journal of biological chemistry*, 295(10), 2890–2899. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.011578>
45. Gollwitzer, P., Grützmacher, N., Wilhelm, S., Kümmel, D., & Demetriades, C. (2022). A Rag GTPase dimer code defines the regulation of mTORC1 by amino acids. *Nature cell biology*, 24(9), 1394–1406. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00976-y>
46. Tsun, Z. Y., Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Zoncu, R., Wang, T., Kim, C., Spooner, E., & Sabatini, D. M. (2013). The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Molecular cell*, 52(4), 495–505. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.016>
47. Shen, K., Huang, R. K., Brignole, E. J., Condon, K. J., Valenstein, M. L., Chantranupong, L., Bomaliyamu, A., Choe, A., Hong, C., Yu, Z., & Sabatini, D. M. (2018). Architecture of the human GATOR1 and GATOR1-Rag GTPases complexes. *Nature*, 556(7699), 64–69. <https://doi.org/10.1038/nature26158>
48. Cai, W., Wei, Y., Jarnik, M., Reich, J., & Lilly, M. A. (2016). The GATOR2 Component Wdr24 Regulates TORC1 Activity and Lysosome Function.

- PLoS genetics, 12(5), e1006036.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006036>
49. Kim, J. S., Ro, S. H., Kim, M., Park, H. W., Semple, I. A., Park, H., Cho, U. S., Wang, W., Guan, K. L., Karin, M., & Lee, J. H. (2015). Sestrin2 inhibits mTORC1 through modulation of GATOR complexes. *Scientific reports*, 5, 9502. <https://doi.org/10.1038/srep09502>
50. Zhang, C. S., Li, M., Zong, Y., & Lin, S. C. (2018). Determining AMPK Activation via the Lysosomal v-ATPase-Ragulator-AXIN/LKB1 Axis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1732, 393–411. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7598-3\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7598-3_25)
51. Mao, Z., & Zhang, W. (2018). Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2043. <https://doi.org/10.3390/ijms19072043>
52. Raevsky, A., Kovalenko, O., Bulgakov, E., Sharifi, M., Volochnyuk, D., & Tukalo, M. (2024). Developing a comprehensive solution aimed to disrupt LARS1/RagD protein-protein interaction. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 42(2), 747–758. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2194996>
53. Peracchi A. (2018). The Limits of Enzyme Specificity and the Evolution of Metabolism. *Trends in biochemical sciences*, 43(12), 984–996. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.015>
54. Peracchi, A., & Polverini, E. (2022). Using Steady-State Kinetics to Quantitate Substrate Selectivity and Specificity: A Case Study with Two Human Transaminases. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(4), 1398. <https://doi.org/10.3390/molecules27041398>
55. Dunlop, R. A., Cox, P. A., Banack, S. A., & Rodgers, K. J. (2013). The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PloS one*, 8(9), e75376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075376>

56. Cvetesic, N., Palencia, A., Halasz, I., Cusack, S., & Gruic-Sovulj, I. (2014). The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline. *The EMBO journal*, 33(15), 1639–1653. <https://doi.org/10.15252/emj.201488199>
57. Kisumi, M., Sugiura, M., & Chibata, I. (1976). Biosynthesis of norvaline, norleucine, and homoisoleucine in *Serratia marcescens*. *Journal of biochemistry*, 80(2), 333–339. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131281>
58. Soini, J., Falschlehner, C., Liedert, C., Bernhardt, J., Vuoristo, J., & Neubauer, P. (2008). Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110. *Microbial cell factories*, 7, 30. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-30>
59. Xu, D., Sánchez-López, E., Wang, Q., Jiang, Z., & Marina, M. L. (2020). Determination of l-norvaline and l-tryptophan in dietary supplements by nano-LC using an O-[2-(methacryloyloxy)-ethylcarbamoyl]-10,11-dihydroquinidine-silica hybrid monolithic column. *Journal of pharmaceutical analysis*, 10(1), 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.10.001>
60. Williams, K. T., & Schalinske, K. L. (2010). Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *BioFactors (Oxford, England)*, 36(1), 19–24. <https://doi.org/10.1002/biof.71>
61. Selhub J. (1999). Homocysteine metabolism. *Annual review of nutrition*, 19, 217–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.217>
62. Baumgartner, E. R., Stokstad, E. L., Wick, S. H., Watson, J. E., & Kusano, G. (1985). Comparison of folic acid coenzyme distribution patterns in patients with methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthetase deficiencies. *Pediatric research*, 19(12), 1288–1292. <https://doi.org/10.1203/00006450-198512000-00017>
63. Khayati, K., Antikainen, H., Bonder, E. M., Weber, G. F., Kruger, W. D., Jakubowski, H., & Dobrowolski, R. (2017). The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal

- proteins in human neurons and mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(2), 598–609. <https://doi.org/10.1096/fj.201600915R>
64. Sato, K., Nishii, T., Sato, A., & Tatsunami, R. (2020). Autophagy activation is required for homocysteine-induced apoptosis in bovine aorta endothelial cells. *Heliyon*, 6(1), e03315. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03315>
65. Fu, Y., Zhao, J., & Chen, Z. (2018). Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2018, 3502514. <https://doi.org/10.1155/2018/3502514>
66. Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC biology*, 9, 71. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71>
67. Su, H., & Xu, Y. (2018). Application of ITC-Based Characterization of Thermodynamic and Kinetic Association of Ligands With Proteins in Drug Design. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1133. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01133>
68. Velázquez Campoy, A., & Freire, E. (2005). ITC in the post-genomic era...? Priceless. *Biophysical chemistry*, 115(2-3), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.12.015>
69. Vinciauskaite, V., & Masson, G. R. (2023). Fundamentals of HDX-MS. *Essays in biochemistry*, 67(2), 301–314. <https://doi.org/10.1042/EBC20220111>
70. Platzer, G., Ptaszek, A. L., Böttcher, J., Fuchs, J. E., Geist, L., Braun, D., McConnell, D. B., Konrat, R., Sánchez-Murcia, P. A., & Mayer, M. (2024). Ligand <sup>1</sup>H NMR Chemical Shifts as Accurate Reporters for Protein-Ligand Binding Interfaces in Solution. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 25(1), e202300636. <https://doi.org/10.1002/cphc.202300636>

71. Cala, O., Guillièrre, F., & Krimm, I. (2014). NMR-based analysis of protein-ligand interactions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(4), 943–956. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0>
72. Turnbull, A. P., & Emsley, P. (2013). Studying protein-ligand interactions using X-ray crystallography. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1008, 457–477. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_17)
73. Stryer L. (1968). Fluorescence spectroscopy of proteins. *Science* (New York, N.Y.), 162(3853), 526–533. <https://doi.org/10.1126/science.162.3853.526>
74. Dos Santos Rodrigues, F. H., Delgado, G. G., Santana da Costa, T., & Tasic, L. (2023). Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts. *BBA advances*, 3, 100091. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100091>
75. Ghisaidoobe, A. B., & Chung, S. J. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International journal of molecular sciences*, 15(12), 22518–22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
76. Miyawaki, A., Sawano, A., & Kogure, T. (2003). Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nature cell biology*, Suppl, S1–S7.
77. Griffin, B. A., Adams, S. R., & Tsien, R. Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* (New York, N.Y.), 281(5374), 269–272. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.269>
78. Day, R. N., & Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society reviews*, 38(10), 2887–2921. <https://doi.org/10.1039/b901966a>
79. Talukder, P., Chen, S., Liu, C. T., Baldwin, E. A., Benkovic, S. J., & Hecht, S. M. (2014). Tryptophan-based fluorophores for studying protein conformational changes. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(21), 5924–5934. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.015>
80. Permyakov, E. A., & Burstein, E. A. (1984). Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence.

- Biophysical chemistry, 19(3), 265–271. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(84\)87009-x](https://doi.org/10.1016/0301-4622(84)87009-x)
81. Vivian, J. T., & Callis, P. R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical journal*, 80(5), 2093–2109. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76183-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76183-8)
82. Weinberg R. B. (1988). Exposure and electronic interaction of tyrosine and tryptophan residues in human apolipoprotein A-IV. *Biochemistry*, 27(5), 1515–1521. <https://doi.org/10.1021/bi00405a018>
83. Hellmann, N., & Schneider, D. (2019). Hands On: Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1958, 379–401. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9161-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9161-7_20)
84. Yamine, A., Gao, J., & Kwan, A. H. (2019). Tryptophan Fluorescence Quenching Assays for Measuring Protein-ligand Binding Affinities: Principles and a Practical Guide. *Bio-protocol*, 9(11), e3253. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3253>
85. Gehlen, Marcelo. (2019). The Centenary of the Stern-Volmer Equation of Fluorescence Quenching: From the single line plot to the SV quenching map. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 42. 100338. [10.1016/j.jphotochemrev.2019.100338](https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100338).
86. Schibilla, F., Stegemann, L., Strassert, C. A., Rizzo, F., & Ravoo, B. J. (2016). Fluorescence quenching in  $\beta$ -cyclodextrin vesicles: membrane confinement and host-guest interactions. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 15(2), 235–243. <https://doi.org/10.1039/c5pp00226e>
87. Levitus M. (2020). Tutorial: measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. *Methods and applications in fluorescence*, 8(3), 033001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10>

- 88.Zazeri, G., Povinelli, A. P. R., Lima, M. F., & Cornélio, M. L. (2020). Detailed Characterization of the Cooperative Binding of Piperine with Heat Shock Protein 70 by Molecular Biophysical Approaches. *Biomedicines*, 8(12), 629. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120629>
- 89.Rybak, M. Y., Rayevsky, A. V., Gudzera, O. I., & Tukalo, M. A. (2019). Stereospecificity control in aminoacyl-tRNA-synthetases: new evidence of d-amino acids activation and editing. *Nucleic acids research*, 47(18), 9777–9788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz756>