

ОЧИСТКА И СВОЙСТВА ДВУХ ФОРМ ЛЕЙЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ ИЗ МИОКАРДА СВИНЬИ

Р. Р. Стапуленис, Л. Л. Иванов,
Л. Ю. Лукошявичюс, В. В. Ярмоленко, А. К. Прашкявичюс

Характерной особенностью эукариотических аминоксил-тРНК-синтетаз (АРСаз) является их способность образовывать высокомолекулярные комплексы [1]. Вопрос о функциональном значении надмолекулярной организации АРСаз все еще далек от окончательного решения. Предполагается [2], что одна из функций комплексов заключается в стабилизации АРСазных активностей, однако есть данные [3], противоречащие этому предположению.

В данной работе описано разделение низкомолекулярной (свободной) и высокомолекулярной (ассоциированной в комплекс) форм лейцил-тРНК-синтетазы (лейРС, КФ 6.1.1.4) из миокарда свиньи и приведены результаты сравнения их некоторых физико-химических свойств, в том числе стабильности при термоинактивации.

Материалы и методы. Реактивы: трис — фирмы «Sigma» (США); глицерин — фирмы «Serva» (ФРГ); АТР, сульфат аммония, хлорид аммония, оксиапатит, 2-меркаптоэтанол, фенолметилсульфонилфторид — фирмы «Merck» (ФРГ); ДЭАЭ-целлюлоза — фирмы «Whatman» (Англия); сефарозы 4В, 6В — фирмы «Pharmacia» (Швеция); сахароза, свободная от примесей рибонуклеаз — фирмы «BioRad» (США). ^{14}C -лейцин (Чехословакия) имел удельную радиоактивность 8880 МБк/ммоль.

Сердца свиней немедленно после забоя животных замораживали при -70°C . Суммарную тРНК из миокарда получали, как описано ранее [4].

Очистка лейцил-тРНК-синтетазы. Растворы, использованные при выделении фермента: буфер А (0,01 М трис-НСl, рН 8,2, 0,35 М сахароза, 0,01 М MgCl_2 , 0,02 М NH_4Cl , $5 \cdot 10^{-5}$ М Na_2 ЭДТА); буфер Б (0,01 М трис-НСl, рН 8,2, 0,01 М MgCl_2 , 0,02 М NH_4Cl); буфер В (0,03 М калий-фосфатный буфер, рН 6,8); буфер Г (0,02 М калий-фосфатный буфер, рН 6,8); буфер Д (0,01 М трис-НСl, рН 8,2, 0,01 М MgCl_2). Для стабилизации фермента все используемые растворы содержали 10 %-ный глицерин, $1 \cdot 10^{-4}$ М фенолметилсульфонилфторид и 0,02 М 2-меркаптоэтанол.

700—800 г ткани миокарда свиньи гомогенизировали в 2,5 объемах буфера А и центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин, надосадочную жидкость ультрацентрифугировали при $105000 \times g$ в течение 1 ч. Белки надосадочной жидкости осаждали сульфатом аммония (65 % насыщения), осадок собирали центрифугированием, растворяли в буфере Б и диализовали против того же буфера. Раствор белка после диализа хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Белок элюировали линейным градиентом концентрации хлорида аммония (0,02—0,5 М) в буфере Б. Следующий этап очистки лейРС проводили по методике, предложенной в работе [5]. Осажденный сульфатом аммония белок, содержащий лейцил-тРНК-синтетазную активность, смешивали с сефарозой 4В и заполняли колонку. Белок элюировали линейным градиентом концентрации сульфата аммония (50—20 % насыщения) в буфере В. Фракции, содержащие лейцил-тРНК-синтетазную активность, диализовали против буфера Г и фракционировали на колонке с оксиапатитом. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации калий-фосфатного буфера (0,02—0,5 М). Каждый пик лейцил-тРНК-синтетазной активности дополнительно очищали на колонке с сефарозой 6В. Элюцию лейРС проводили буфером Д.

Активность лейРС определяли по начальной скорости аминокислотирования тРНК ^{14}C -лейцином. Реакционная смесь содержала в объеме 0,1 мл: 150 мМ трис-НСl, рН 7,7, 15 мМ KCl , 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ АТР, 0,05 мМ ^{14}C -лейцин, 50 мкг суммарной тРНК и 2—5 мкг фермента. Реакционную смесь инкубировали 5 мин при 25°C , после чего добавляли двойной объем 10 %-ной трихлоруксусной кислоты. Осадки промывали на нитроцеллюлозных фильтрах и радиоактивность проб измеряли на сцинтилляционном счетчике «Delta-300» (Голландия).

Концентрацию лейРС определяли по методу Лоури [6], а в процессе очистки фермента — по методу Варбурга [7].

Термоинактивацию лейРС изучали при 25, 30, 37 и 42 °С. Фермент инкубировали в буфере Д, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и вносили их в инкубационную смесь для проведения реакции аминокислотирования. Константы термоинактивации (K_i) рассчитывали, как описано ранее [8].

Седиментационный анализ лейРС проводили в ультрацентрифуге «Sorvall OTD-75» (США), (ротор АН 650) при 4 °С. Константы седиментации определяли по методике [9].

Спектры флюоресценции регистрировали на спектрофлюориметре «Hitachi» модель 650—60 (Япония). Условия измерения: длина волны возбуждения 280 нм, спектральная ширина щелей возбуждения и флюоресценции 2 нм, скорость сканирования 60 нм/мин, режим отношения сигналов, схема измерения флюоресценции под углом 90°. Все спектры корректировали в автоматическом режиме. Термоденатурацию лейРС изучали в диапазоне 10—60 °С.

Результаты и обсуждение. При хроматографии на оксиаплате лейРС миокарда свиньи разделяется на две формы E_1 и E_2 . В предыдущих исследованиях [10] было показано, что E_1 представляет собой индивидуальный фермент с молекулярной массой 158000. Форма E_2 наряду с лейцил-тРНК-синтетазой содержит АРСазные активности других аминокислотных специфичностей и представляет макромолекулярный комплекс этих ферментов с молекулярной массой 840000. Значения констант седиментации составляют 8S для E_1 и 12,3 и 32S для E_2 . Наличие двух пиков лейцил-тРНК-синтетазной активности, различающихся по значениям констант седиментации, для E_2 может быть связано с диссоциацией комплекса АРСаз в процессе центрифугирования.

В дальнейших исследованиях было проведено сравнение свойств лейРС в свободном и агрегированном состояниях. Известно, что на активность АРСаз существенное влияние могут оказывать ионы K^+ . В работе [11] было показано, что активность аспартил-тРНК-синтетазы в составе высокомолекулярного комплекса, выделенного из щитовидной железы свиньи, значительно стимулируется различными солями калия, в то время как активность свободного фермента этими же солями ингибируется. Мы установили, что присутствие в реакционной смеси 20 мМ КСl (рис. 1) несколько увеличивает активность E_1 лейРС миокарда, в то время как указанная концентрация соли практически не влияет на лейцил-тРНК-синтетазную активность E_2 . Увеличение концентрации КСl ингибировало ферментативную активность обеих форм лейРС (рис. 1). Аналогичный эффект наблюдался и при добавлении в реакционную смесь KH_2PO_4 . Таким образом, наши данные противоречат предположению о возможности регуляции активности АРСаз, входящих в состав высокомолекулярного комплекса, ионами K^+ [11].

Последующая серия экспериментов была посвящена исследованию каталитических свойств лейРС. Данные обрабатывали методом двойных обратных величин Лайнуивера—Берка [12]. Результаты кинетического изучения двух форм лейРС представлены в таблице. Значения K_m для E_1 и E_2 по всем субстратам реакции являются величинами одного порядка. Однако для E_2 наблюдается некоторое увеличение K_m по

Кинетические параметры реакции аминокислотирования для лейцил-тРНК-синтетазы миокарда свиньи

Kinetic parameters of the aminoacylation reaction for leucyl-tRNA synthetase from pig myocardium

Форма фермента	K_m			V_{\max} , М·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹	K_i , мин ⁻¹
	АТР, М·10 ⁻³	Лейцин, М·10 ⁻⁵	тРНК, М·10 ⁻⁶		
E_1	3,9	0,7	1,6	20,6·10 ⁻⁶	0,106
E_2	12,8	2,7	0,4		

АТР и лейцину и уменьшение по тРНК в сравнении с E_1 . Увеличение значений K_m по АТР и лейцину может быть связано с меньшей доступностью для субстратов лейРС, ассоциированной в высокомолекулярный комплекс. Подобное явление было описано для глутамил- и глутаминил-тРНК-синтетаз, входящих в состав высокомолекулярных комплексов мозга быков [13]. С другой стороны, наблюдаемое уменьшение K_m

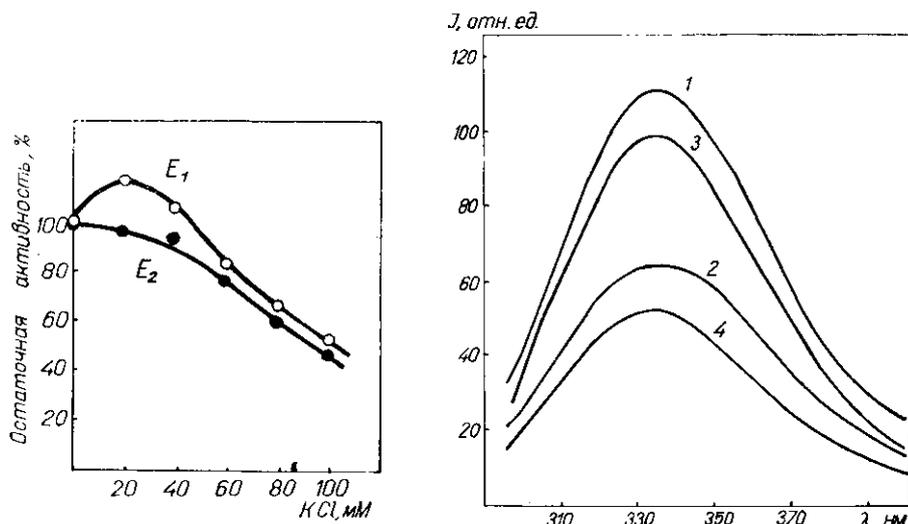


Рис. 1. Зависимость активности лейцил-тРНК-синтетазы от концентрации KCl.
Fig. 1. The effects of KCl concentrations on the activity of leucyl-tRNA synthetase.

Рис. 2. Спектры флюоресценции двух форм лейцил-тРНК-синтетазы из миокарда свиньи при разных температурах: 1, 2 — E_1 при 20 и 40°C соответственно; 3, 4 — то же для E_2 . $\lambda_{возб}$ = 280 нм, оптическая плотность 0,2; 0,1 М трис-HCl (pH 8,2).

Fig. 2. Fluorescence spectra of two forms of leucyl-tRNA synthetase from pig myocardium at different temperatures: 1, 2 — E_1 at 20 and 40°C, respectively; 3, 4 — the same for E_2 . λ_{ex} = 280 nm, absorbance 0.2; 0.1 M tris-HCl (pH 8.2).

по тРНК, также обнаруженное рядом авторов [14, 15], не указывает на наличие стерических препятствий для субстратов в высокомолекулярном комплексе.

На рис. 2 приведены спектры флюоресценции двух форм лейРС при pH 8,2. По положению и форме спектра не отмечено существенных различий спектров флюоресценции E_1 и E_2 . Они представляют собой широкие бесструктурные полосы с максимумом флюоресценции (λ_{max}) 335 и 333 нм и полушириной спектров ($\Delta\lambda$) 64 и 63 нм соответственно. Несмотря на более высокие значения $\Delta\lambda$ по сравнению с данными авторов [16, 17], установленные параметры флюоресценции указывают на то, что в белке и комплексе хромофоры локализованы как в областях, малодоступных растворителю, так и в местах возможного контакта с ним [16—18].

Для оценки стабильности структуры E_1 и E_2 было проведено исследование температурных зависимостей параметров флюоресценции в диапазоне температур от 10 до 60°C. Известно, что с повышением температуры происходит падение квантового выхода флюоресценции белков [16]. При температурах выше 35°C для E_1 и E_2 наблюдается небольшой сдвиг спектра флюоресценции в длинноволновую область на 2 нм и уширение спектра. Такие изменения типичны для процесса денатурации белковой глобулы [16, 19]. Стабильность структуры двух форм лейРС анализировали и по середине термоденатурационного перехода, равного значению температуры, при котором параметры флюоресценции достигают половины своего максимального изменения. При незначительных изменениях положения и формы спектра величина максимальной интенсивности спектра (I_{max}) может быть использована в

качестве меры завершенности перехода [16]. При анализе данных использовали обратную величину интенсивности ($1/I_{\max}$), зависящую от температуры (T , К) и вязкости раствора (η) [20].

Результаты проведенного анализа представлены на рис. 3. Кривая между линейными участками зависимости отражает термоденатурационные перестройки белка. Середина этого перехода как для E_1 , так и для E_2 лежит в диапазоне температур 40—44 °С. Таким образом, следует заключить, что в зоне температур до 35 °С E_1 и E_2 нативны, а при температурах выше 45 °С денатурируют необратимо. На рис. 3 обращает на себя внимание разница поведения кривых температурных зависимостей для E_1 и E_2 при температурах выше 45 °С, что может быть отражением

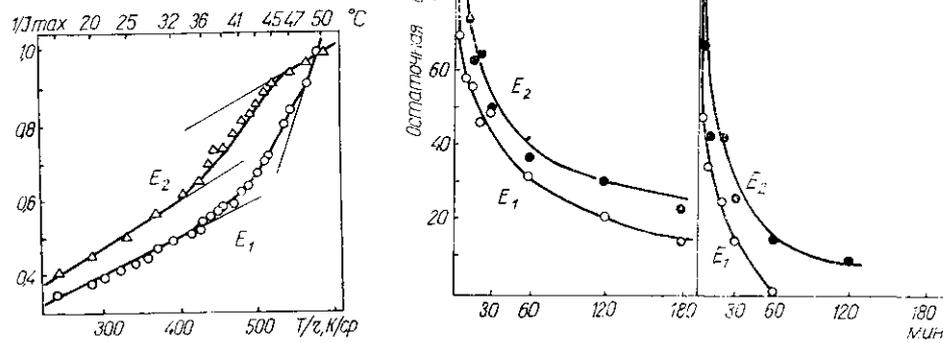


Рис. 3. Температурные зависимости параметра $1/I_{\max}$ от T/η для E_1 и E_2 . Условия, как на рис. 2.

Fig. 3. Temperature dependences of the parameter $1/I_{\max}$ vs. T/η for E_1 and E_2 . Conditions as in Fig. 2.

Рис. 4. Термоинактивация лейцил-tPHK-синтетазной активности при 25 (А), 30 (Б), 37 (В) и 42 °С (Г).

Fig. 4. Thermal inactivation of leucyl-tRNA synthetase activity at 25 (A), 30 (B), 37 (V) and 42 °С (Г).

принципиального различия структур E_1 и E_2 . Однозначно интерпретировать результаты изучения термоденатурации E_1 и E_2 и сравнить их между собой довольно сложно. Совокупность данных по флюоресценции свидетельствует о том, что структурные перестройки E_1 и E_2 представляют собой сложные многостадийные процессы. Более того, для E_2 могут иметь место не только мономолекулярные явления, как для E_1 , но приобретают значение и межмолекулярные взаимодействия.

Было проведено также сравнение степени термоинактивации обеих форм лейРС по изменению ферментативной активности при различных температурах. Полученные данные (таблица, рис. 4) свидетельствуют о том, что E_1 характеризуется более высоким значением K_i , чем E_2 , при температуре 42 °С. Форма E_2 более устойчива к термоинактивации, чем E_1 , также при температуре 25, 30 и 37 °С (рис. 4). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что лейРС в составе высокомолекулярного комплекса миокарда свиньи более устойчива к термоинактивации, чем свободная форма фермента.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что лейРС в кардиомиоцитах свиньи присутствует в виде двух форм — свободной и ассоциированной в комплекс с другими АРСазами. Наличие свободной формы фермента может быть результатом эндогенного протеоли-

за комплекса, как в случае метионил-тРНК-синтетазы из гепатоцитов крысы [15]. Для решения этого вопроса необходимо выделить лейРС из состава высокомолекулярного комплекса и сравнить ее структурно-функциональные свойства со свободным ферментом.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF TWO FORMS OF LEUCYL-tRNA SYNTHETASE FROM PIG MYOCARDIUM

R. R. Stapulionis, L. L. Ivanov, L. J. Lukoševičius,
V. V. Yarmolenko, A. K. Praškevičius

Medical Institute, Kaunas

Summary

A method for isolation and purification of two forms (E_1 and E_2) of leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) from pig myocardium is described. E_1 is a free enzyme with molecular weight of 158000. E_2 is a complex of aminoacyl-tRNA synthetases with molecular weight of 840000. The values of sedimentation constants were 8S for E_1 and 32S for E_2 . The effect of K^+ and kinetic parameters of the aminoacylation reaction for the both forms of the enzyme are studied. The K_m values of E_1 for ATP and leucine were greater and for tRNA were lower than those of E_2 . The evaluation of thermal conformational transitions of two forms of LeuRS is carried out. According to the intrinsic protein fluorescence method, the midpoint of denaturation transition for E_1 and E_2 is in the temperature range between 4 and 44 °C. LeuRS activity of the high-molecular weight complex is more resistant to thermal inactivation than that of free enzyme.

1. Dang C. V., Johnson D. L., Yang D. C. H. High molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complexes in eukaryotes // FEBS Letters.—1982.—142, N 1.—P. 1—6.
2. Dang C. V. High molecular weight complex formation of rat liver lysyl-tRNA synthetase reduces enzyme lability to thermal inactivation // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1982.—106, N 1.—P. 44—47.
3. Аминоацил-тРНК-синтетазы и их высокомолекулярные комплексы из регенерирующей печени крыс / А. Д. Яремчук, Л. Э. Тарасевичене, Т. П. Кондратюк, А. В. Ельская // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.—С. 1336—1341.
4. Изучение молекулярных основ нарушения биосинтеза белка при экспериментальном инфаркте миокарда и аутолизе миокарда / М. И. Коваленко, Г. А. Родовичюс, А. И. Тамулявичюс и др. // Молекуляр. биология.—1984.—Вып. 37.—С. 18—21.
5. Gabius H.-J., von der Haar F., Cramer F. Purification by salting-out chromatography and properties of phenylalanyl-tRNA synthetase from turkey liver // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.—1983.—364, N 1.—P. 71—81.
6. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. Lowry, N. Rosenbrought, N. Farr, R. Randall // J. Biol. Chem.—1951.—193, N 1.—P. 265—275.
7. Warburg O., Christian W. Isolierung uns Kristallisation des Gärungsferments Enolase // Biochem. Z.—1941.—310, N 2.—P. 384—421.
8. Chuang H. J. K., Bell F. E. Use of a thermal inactivation technique to obtain binding constants for the *Escherichia coli* valyl-tRNA synthetase // Arch. Biochem. and Biophys.—1972.—152, N 2.—P. 502—514.
9. Martin R. G., Ames B. N. A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: applications to protein mixtures // J. Biol. Chem.—1961.—236, N 5.—P. 1372—1379.
10. Иванов Л. Л., Стапуленис Р. Р., Лукошявичюс Л. Ю. Выделение и характеристика лейцил-тРНК-синтетазы из тканей млекопитающих // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 3.—С. 154—156.
11. Vellekamp G. J., Kull F. J. Allotropism in aspartyl-tRNA synthetase from porcine thyroid // Eur. J. Biochem.—1981.—118, N 2.—P. 261—269.
12. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики.—М.: Мир, 1979.—280 с.
13. Vadeboncoeur C., Lapointe J. Slow diffusion of glutamate and ATP-Mg into high-molecular-weight complexes containing the glutamyl-tRNA synthetase from bovine brain // Eur. J. Biochem.—1980.—109, N 2.—P. 581—587.
14. Johnson D. L., Dang C. V., Yang D. C. H. Purification and characterization of lysyl-tRNA synthetase after dissociation of the particulate aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver // J. Biol. Chem.—1980.—255, N 9.—P. 4362—4366.
15. Siddiqui F. A., Yang D. C. H. Generation of multiple forms of methionyl-tRNA synthetase from the multi-enzyme complex of mammalian aminoacyl-tRNA synthetases by endogenous proteolysis // Biochim. et biophys. acta.—1985.—828, N 2.—P. 177—187.
16. Буригейн Э. А. Собственная люминесценция белков (природа и применение).—М.: ВИНТИ, 1977.—Т. 7.—189 с.
17. Спектральные характеристики мышечных аспартил- и валил-тРНК-синтетаз в норме и при экспериментальной модели полного и длительного голодания животных /

- В. Н. Глушак, А. П. Демченко, Н. Н. Орловская, М. Ф. Гулый // Молекуляр. биология.— 1984.—18, № 5.— С. 1330—1335.
18. Корнелюк А. И., Мацука Г. Х., Шилин В. В. Флуоресцентный анализ доступности триптофановых остатков лейцил-тРНК-синтетазы в фермент субстратных комплексах // Биофизика.— 1980.—25, № 3.— С. 402—404.
19. Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке.— Минск: Наука и техника, 1972.—278 с.
20. *Permyakov E. A., Burstein E. A.* Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence // Biophys. Chem.— 1984.—19, N 2.— P. 265—271.

Каунас. мед. ин-т

Получено 28.10.85

УДК 547.963.3

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРАНСЛЯЦИОННО АКТИВНОЙ ПОЛИ(А)⁺ И ПОЛИ(А)⁻ мРНК ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ ПРОРАСТАЮЩИХ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

Н. Г. Филимонов, А. О. Агашкин, О. Д. Саблина, М. А. Айтхожин

Введение. Проведенные нами ранее исследования цитоплазматических мРНК в прорастающих зародышах пшеницы показали, что они локализованы в составе полирибосом и свободных информосом [1, 2]. Свободные информосомы, очевидно, представляют запасную или временно неактивную форму мРНК [3]. Было установлено, что в составе полирибосом около 40 % мРНК полиаденилированы, в то время как в составе свободных информосом большинство мРНК не содержат полиадениловых последовательностей [4]. Исследование метаболических взаимоотношений между этими популяциями поли(А)⁺ и поли(А)⁻ мРНК представляет большой интерес для изучения биогенеза информационной РНК. В настоящее время общепринятым методом выделения поли(А)⁺ мРНК является хроматография на олиго(dT)-целлюлозе, тогда как очистка поли(А)⁻ мРНК представляет значительные трудности.

В нашей работе из полирибосом и свободных цитоплазматических информосом прорастающих зародышей пшеницы хроматографией на олиго(dT)-целлюлозе и бензоилированной целлюлозе выделены препараты поли(А)⁺ и поли(А)⁻ мРНК. Проведено сравнительное исследование их молекулярно-весовых характеристик и трансляционной активности в бесклеточной белоксинтезирующей системе.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на зародышах пшеницы сорта «Казахстанская-4». Зародыши выделяли из сухих семян и проращивали при 26 °С в течение 20 ч, как описано ранее [5].

Выделение полирибосом и свободных цитоплазматических информосом. Зародыши пшеницы после проращивания замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в буферном растворе: 0,01 М трис-НСl, рН 8,0, 0,05 М КСl, 0,005 М MgCl₂, 0,25 М сахаразы; 0,005 М 2-меркаптоэтанол (МЭ), 0,01 М ванадилрибонуклеозидный ингибитор (VRC). Гомогенат центрифугировали при 3000 g для освобождения от ядер и неразрушенных клеток, затем при 23000 g — от митохондрий и хлоропластов. К постмитохондриальному клеточному экстракту добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 0,5 % и наслаивали его на 10 мл 1,5 М сахаразы. Центрифугированием при 43000 об/мин и температуре 3 °С в течение 3 ч в роторе Туре-45·Ti полирибосомы осаждали на дно пробирки.

Для выделения фракции внеполисомных мРНК-содержащих рибонуклеопротеидов клеточный экстракт после осаждения полирибосом подвергали ультрацентрифугированию через 0,5 М сахаразу в течение 5 ч при 43000 об/мин в роторе Туре-45·Ti, 3 °С. Свободные цитоплазматические информосомы получали после дополнительной очистки препарата в градиенте концентрации сахаразы 15—30 %.

Выделение цитоплазматических РНК из полирибосом и внеполисомных информосом проводили по методу Перри и др. [6].