

Т. А. Рибкинска, А. И. Корнелюк, С. Ф. Берестень, Г. Х. Мацука

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ СТРУКТУРЫ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ БЫКА**

В данной работе нами показано, что антигенная детерминанта для мАт  $T_3$  против тирозил-тРНК синтетазы (КФ 6.1.1.1) из печени быка расположена вне активного центра фермента. С помощью мАт  $T_3$  показано, что антигенная детерминанта сохраняется и для функционально активной протеолитически модифицированной формы фермента, в которой отщеплен фрагмент полипептидной цепи длиной 20 000. Тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих (печень быка, печень кроля) имеют общую антигенную детерминанту линейного типа, которая отсутствует у низших эукариот (дрожжей) и бактерий, т. е. является эволюционно приобретенной только тирозил-тРНК синтетазой высших эукариот.

**Введение.** В настоящее время моноклональные антитела (мАт) широко используются при изучении структурных элементов белков, выполняющих близкие функции у эволюционно отдаленных видов [1]. Факт обнаружения с помощью мАт общей антигенной детерминанты у триптофанил-тРНК синтетаз эукариот, прокариот и архебактерий свидетельствует об исключительно древнем происхождении аминоксил-тРНК синтетаз и об общем предковом ядре для всех триптофанил-тРНК синтетаз [1, 2].

Тирозил-тРНК синтетазы из печени быка, выделенная нами ранее [3], представляет собой структурный и функциональный димер  $\alpha_2$ -типа с молекулярной массой  $2 \times 59\,000$ . Наряду с основной формой синтетазы выделена и изучена также форма тирозил-тРНК синтетазы с меньшей молекулярной массой ( $2 \times 39\,000$ ), которая является результатом ограниченного протеолиза основной формы и полностью сохраняет активность как в реакции аминокислотирования тРНК<sup>Tyr</sup>, так и в реакции АТР<sup>[<sup>32</sup>P]</sup>пирофосфатного обмена [3, 4].

Ранее нами были получены мАт  $T_3$  к тирозил-тРНК синтетазе из печени быка и показано, что антигенная детерминанта для мАт  $T_3$ , по видимому, линейного типа [5]. Представляет интерес локализация антигенной детерминанты на полипептидной цепи тирозил-тРНК синтетазы и возможность ее сохранения у протеолитически модифицированной формы. Поскольку антигенная детерминанта сохраняется в денатурирующих условиях, становится возможным использовать метод иммуноблоттинга с целью поиска общих антигенных детерминант тирозил-тРНК синтетаз из различных источников.

**Материалы и методы.** Для выделения тирозил-тРНК синтетазы использовали следующие буферы: А — 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 %-ный глицерин, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 1 мМ диизопропилфторофосфат; Б — 25 мМ калий-фосфат, рН 7,5, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 5 %-ный глицерин.

Активность тирозил-тРНК синтетазы определяли, как описано ранее [3], используя суммарную тРНК из дрожжей и *Escherichia coli* («Boehringer Mannheim», Австрия).

Экстракты печени быка и кроля фракционировали 50 %-ным полиэтиленгликолем-6000 («Мерск», ФРГ). Осадок (5—9 %) растворяли в буфере Б, наносили на колонку DEAE-Toyopearl 650 M и элюировали линейным градиентом концентрации 0—0,3 M KCl в буфере Б. Активные фракции, элюирующиеся при 60—90 мМ KCl, объединяли, разводили в два раза буфером Б и наносили на колонку моноS HR 5/5 («Pharmacia», Швеция). Элюцию белка вели градиентом концентрации 0—0,4 M KCl. Активные фракции, элюирующиеся при 80 мМ KCl, объединяли, разводили в два раза буфером Б и наносили на колонку моноQ. Хроматографические условия для стадии моноQ те же, что и для мо-

поS. Активные фракции, содержащие очищенную тирозил-тРНК синтетазу, замораживали и хранили в жидком азоте.

Протеолитически модифицированную форму тирозил-тРНК синтетазы из печени быка получали, как описано ранее [4].

Клетки и ткани экстрагировали гомогенизацией в буфере А. Гомогенат центрифугировали при 12 000 *g* 20 мин. Препараты тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli*, *Thermus thermophilus* и из дрожжей получали двухстадийной очисткой, проводя последовательно хроматографии на ДЕАЕ-Toyocarl 650 М и на ионообменном сорбенте HR 5/5, очистка по белку была сто- кратной.

Белок определяли, согласно Бред- форду [6].

Электрофорез в полнакриламид- ном геле в присутствии DS-Na проводили на «Phast System» («Pharma- cia»), используя пластины градиентно- го геля 10—15 % этой же фирмы. Диффузный перенос на нитроцеллю- лозный фильтр ВА 85 («Schleicher and Schull», ФРГ) и окраску геля осуществляли по рекомендации фирмы «Pharmacia» [7].

Иммуноблоттинг проводили, как описано ранее [1].

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 приведена зависимость активности тирозил-тРНК синтетазы из печени быка в реакциях амино- ацилирования тРНК<sup>Тур</sup> (1) и АТР[<sup>32</sup>P]пирофосфатного обмена (2) от концентрации мАт Т<sub>3</sub> (пробы для определения ферментативной актив- ности содержали 20 нМ фермента, инкубация 2 мин при 37 °С (1) и 100 нМ фермента, инкубация 10 мин при 37 °С (2)). Как можно ви- деть, взаимодействие мАт Т<sub>3</sub> с тирозил-тРНК синтетазой не оказывает ингибирующего действия на фермент. Даже 20÷100-кратные молярные избытки мАт Т<sub>3</sub> не приводят к изменениям активности тирозил-тРНК синтетазы как в реакции аминоацилирования тРНК<sup>Тур</sup> так и в реакции АТР[<sup>32</sup>P]пирофосфатного обмена. Полученные данные позволяют пред- положить, что антигенная детерминанта для мАт Т<sub>3</sub>, по-видимому, ло- кализована вне активного центра тирозил-тРНК синтетазы.

Как нами показано ранее [3, 4], при выделении бычьей тирозил- тРНК синтетазы при неполном ингибировании протеолиза в присут- ствии только одного ингибитора — фенолметилсульфонилфторида (1 мМ), кроме основной формы фермента (*M<sub>r</sub>* 2×59 000), образуется также функционально активная протеолитически модифицированная форма, имеющая *M<sub>r</sub>* 2×39 000. Отщепление от субъединицы основной формы фермента фрагмента полипептидной цепи длиной около 20 000 не оказывает влияния на активирующую и аминоацилирующую функ- ции фермента [4]. Возникает вопрос, может ли антигенная детермина- та мАт Т<sub>3</sub>, расположенная вне активного центра синтетазы, быть свя- занной с отщепляемым фрагментом? Подобная ситуация обнаружена в случае триптофанил-тРНК синтетазы [8], антигенная детерминанта Ам1 которой локализована на фрагменте полипептидной цепи дли- ной около 9000, отщепляемом при ограниченном протеолизе эластазой.

На рис. 2 приведены данные по изучению иммунореактивности мАт Т<sub>3</sub> с двумя формами тирозил-тРНК синтетазы: основной (1) и про- теолитически модифицированной (2) (*a* — гель окрашен раствором кумасси G-250 (стрелками обозначены положения белков-маркеров и их молекулярные массы); *b* — иммуноблоттинг). Как можно видеть, дан- ные иммуноблоттинга свидетельствуют о том, что антигенная детерми- нанта для мАт Т<sub>3</sub> сохраняется также и у укороченной формы тирозил- тРНК синтетазы.

Существенный интерес представляет изучение эволюционной кон- сервативности антигенной детерминанты у тирозил-тРНК синтетаз из различных источников. Нами проведено изучение взаимодействия мАт

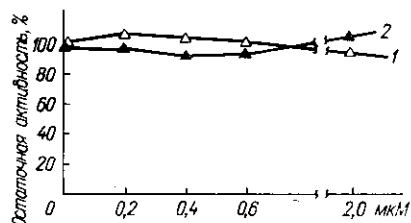


Рис. 1

$T_3$  с тирозил-тРНК синтетазами из прокариот (*E. coli* и *Th. thermophilus*), из низших эукариот (дрожжи) и из тканей млекопитающих (печень кроля, печень быка, плацента человека). По данным иммуноблотинга (рис. 3, а), мАт  $T_3$  взаимодействует с тирозил-тРНК синтетазами из печени быка (дорожка 1) и печени кроля (дорожка 2), т. е. между этими двумя ферментами существует иммунологический перекрест.

Следует отметить также совпадение электрофоретических подвижностей тирозил-тРНК синтетаз из печени быка и из печени кроля (рис. 3, б), что свидетельствует о большой близости или идентичности

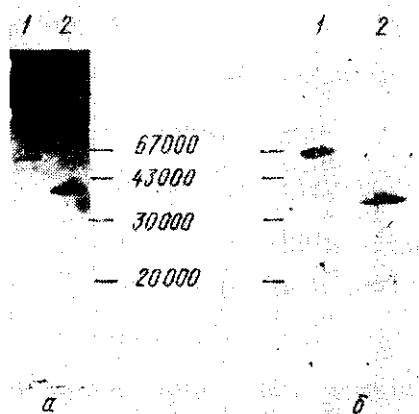


Рис. 2

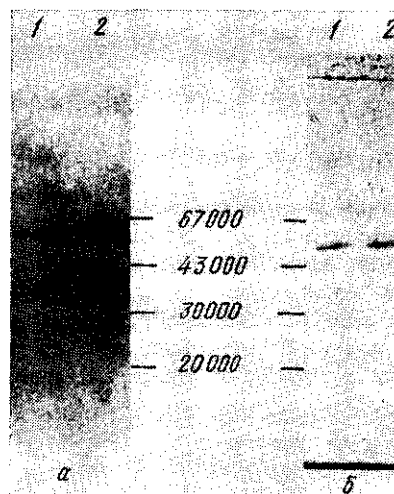


Рис. 3

ти размеров полипептидных цепей этих ферментов млекопитающих. Имеющиеся данные литературы по этому вопросу [9—11] являются весьма противоречивыми.

В то же время, по данным дот-анализа (рис. 4), не обнаружено взаимодействия мАт  $T_3$  против бычьей тирозил-тРНК синтетазы с тирозил-тРНК синтетазами из *E. coli* (1), *Th. thermophilus* (2) и из дрожжей (3), т. е. данная антигенная детерминанта присутствует только у тирозил-тРНК синтетаз из высших эукариот (остальные дорожки на рис. 4: 4 — тирозил-тРНК синтетаза из печени быка; 5 — из печени кроля; 6 — из плаценты человека).

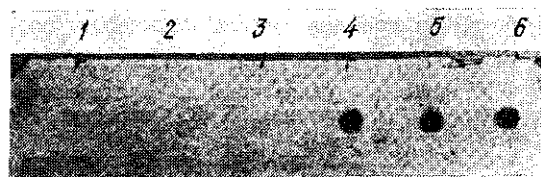


Рис. 4

Принципиальное отличие антигенной детерминанты для мАт  $T_3$  от таковой для Ам1 против триптофанил-тРНК синтетазы, которая также является детерминантой линейного типа [8], состоит в том, что антигенная детерминанта для Ам1 является консервативной и сохраняется у синтетаз из прокариот и эукариот.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать следующие выводы: 1) антигенная детерминанта для мАт  $T_3$  против тирозил-тРНК синтетазы из печени быка локализована вне активного центра фермента; 2) данная антигенная детерминанта сохраняется у протеолитически модифицированной формы фермента, в которой отщеплен фрагмент полипептидной цепи длиной около 20 000, не существенный для каталитической активности; 3) эта антигенная детерминанта является общей для тирозил-тРНК синтетаз млекопитающих

(печень быка, печень кроля, плацента человека) и отсутствует у низших эукариот и бактерий, т. е. является эволюционно приобретенной только тирозил-тРНК синтетазой из высших эукариот.

#### Резюме

В роботі показано, що антигенна детермінанта для мАб Т<sub>3</sub> проти тирозил-тРНК синтетази (КФ 6.1.1.1) із печінки бика розміщена поза активним центром ферменту. За допомогою мАб Т<sub>3</sub> визначено, що антигенна детермінанта зберігається і для функціонально активної протеолітично модифікованої форми ферменту, в якій відсутній фрагмент поліпептидного ланцюга довжиною 20 000. Тирозил-тРНК синтетази ссавців (печінка бика, печінка кроля) мають спільну антигенну детермінанту лінійного типу, якої нема у нижчих еукариот (дріжджі) та бактерій, тобто вона еволюційно надбана тільки тирозил-тРНК синтетазою вищих еукариот.

#### Summary

The antigenic determinant for mAbs T<sub>3</sub> against tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver has been localized outside of the active site of enzyme. This epitope also remains for the active truncated enzyme form (dimer of 39 kDa subunits) product by limited endogenous proteolysis. The tyrosyl-tRNA synthetases of higher eukaryotes (bovine liver, rabbit liver, human placenta) have the common antigenic determinant, which lacks in tyrosyl-tRNA synthetases from prokaryotes (*E. coli*, *Th. thermophilus*) and from yeast as revealed by immunoblot analysis.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Триптофанил-тРНК синтетази эукариот, прокариот и архебактерий имеют общую антигенную детерминанту / Т. А. Заргарова, С. Ф. Берестень, О. О. Фаворова, Л. Л. Киселев / Докл. АН СССР.— 1985.— 285, № 6.— С. 1484—1486.
2. Molecular and cellular studies of tryptophanyl-tRNA synthetase using monoclonal antibodies. Evaluation of common antigenic determinant in eukaryotic, prokaryotic and archaeobacterial enzyme which maps outside the catalytic domain / S. F. Beresteny, T. A. Zargarova, O. O. Favorova et al. // Eur. J. Biochem.— 1989.— 184, N 3.— P. 575—581.
3. Корислюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // Молекуляр. биология.— 1988.— 22, № 1.— С. 176—186.
4. Tyrosyl-tRNA synthetase from beef liver: generation of multiple enzyme forms by endogenous proteolysis / I. V. Kurochkin, T. A. Ribkinska, D. V. Gnatenko et al. // Interferon and biotechnol.: Int. seminar on interferon and biotechnol.— Havana, 1989.— S06.066.
5. Метод селекции гибридом, секретирующих моноклональные антитела к тирозил-тРНК-синтетазе, основанный на определении энзиматической активности / Т. А. Рибкинська, О. А. Варганян, В. В. Филоненко и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 4.— С. 97—101.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // Anal. Biochem.— 1976.— 86, N 1.— P. 193—200.
7. Prost system owners manual (Pharmacia).— Uppsala, 1987.— 10 p.
8. Моноклональные антитела к триптофанил-тРНК синтетазе / С. Ф. Берестень, Т. А. Заргарова, С. В. Костров, О. О. Фаворова // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1407—1411.
9. Deak F., Denes G. Purification and some properties of rat liver tyrosyl-tRNA synthetase // Biochim. et biophys. acta.— 1978.— 526, N 2.— P. 626—634.
10. Prasada Rao Y. S., Srinivasan P. R. Purification and properties of tyrosyl-tRNA synthetase of rat liver // Nucl. Acids Res.— 1977.— 4, N 11.— P. 3887—3900.
11. Takahashi R., Goto S. Fidelity of aminoacylation by rat liver tyrosyl-tRNA synthetase. Effect of age // Eur. J. Biochem.— 1988.— 178, N 2.— P. 381—386.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 09.04.91