



# Структура и функция биополимеров

УДК 577.152.6

Т. И. Аверина, В. А. Драговоз, Н. В. Роднин, Л. Л. Сидорик

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ В ТКАНЯХ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

*Исследовано распределение серил-тРНК синтетазы (СерРС) в органах и тканях различных представителей позвоночных с использованием иммунохимических методов исследования. Показано, что наибольшее относительное содержание данного фермента отмечено в печени всех исследуемых представителей позвоночных (от рыб до человека). Обнаружено наличие высокомолекулярных весьма устойчивых комплексов СерРС с другими белками, сохраняющихся в лизатах эукариотических тканей даже в денатурирующих условиях.*

**Введение.** Различные органы и ткани высших эукариот отличаются степенью метаболизма и соответственно уровнями активности аминоксил-тРНК синтетаз, что может быть связано как с интенсивностью белкового синтеза, так и с аминокислотным составом синтезируемых белков. Одна из аминоксил-тРНК синтетаз высших эукариот — серил-тРНК синтетаза (СерРС) печени быка (КФ 6.1.1.4) — исследована нами ранее [1]. Установлено, что СерРС — фермент типа  $\alpha_2$  с молекулярной массой (м. м.) около 120 000. Получены моноспецифические поликлональные антитела к СерРС печени быка методом аффинной хроматографии и исследованы некоторые иммунохимические свойства данного белка [2]. Иммунохимический подход позволяет получить не только качественно новую информацию о некоторых структурно-функциональных свойствах белков, но и прямо определить относительное содержание исследуемого белка, которое не во всех случаях совпадает с уровнем ферментативной активности. Известно также, что аминоксил-тРНК синтетазы функционируют в составе высокомолекулярных мультиферментных комплексов (так называемых кодосом), и компартментализация метаболических процессов в клетке играет важную роль в функционировании белоксинтезирующего аппарата [3]. Изучение распределения СерРС в органах и тканях высших эукариот также важно и с точки зрения поиска наиболее богатого данным ферментом органа, так как выделение и очистка синтетаз эукариот до гомогенного состояния — весьма трудоемкий процесс, и нахождение «суперпродуцента» облегчило бы эту задачу.

**Материалы и методы.** Материалами исследования служили: печень, почки, мозг и сердце мыши; печень, почки, мозг, поджелудочная железа кролика; печень, гипофиз и поджелудочная железа быка; печень рыбы, печень курицы; печень и сердце человека. Органы заморожены при  $-70^\circ\text{C}$ .

СерРС печени быка выделяли по описанному методу [1].

Поликлональные антитела к СерРС печени быка получали по модифицированному методу Бейли, как описано ранее [2]. Синтез аффин-

ной колонки с высокоочищенным препаратом СерРС печени быка и иммуноаффинную очистку антител к СерРС осуществляли по [2].

Получение лизатов тканей. Ткань мелко нарезали ножницами и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в RIPA-буфере (20 мМ трис-НСI (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 %-й NP-40, 1 %-й дезоксихолат Na, 0,15 М NaCl). Непосредственно перед использованием в буфер добавляли фенолметилсульфонилфторид до концентрации 2,5 мМ. Гомогенаты тканей центрифугировали при 30 000 *g* 30 мин. Содержание суммарного белка в лизатах определяли по Бредфорду [4].

Иммуноферментный анализ (ELISA). Полученные лизаты адсорбировали в лунки 96-луночных планшетов («Flow Laboratory», Англия) (100 мкг суммарного белка в 0,1 мл ФСБ, рН 7,5) при 4 °С в течение ночи либо при 37 °С в течение 2—3 ч. После отмывки ФСБ, содержащим 0,1 %-й твин-20 (ФСБ-Т), свободные сайты адсорбции блокировали 0,3 %-м БСА в ФСБ-Т, и в лунки добавляли моноспецифические поликлональные антитела к СерРС (100 мкг/мл ФСБ-Т). Инкубацию с антителами проводили в течение 1 ч при 20 °С. Все дальнейшие процедуры проводили при 20 °С. Затем лунки отмывали от несвязавшихся антител ФСБ-Т и добавляли биотинилированные антитела козы против цельной молекулы IgG кролика («ДиаГен», Москва), инкубация 1 ч. Лунки отмывали 3—4 раза ФСБ-Т и добавляли авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, инкубация 20 мин. После отмывки 5—6 раз ФСБ-Т и ФСБ продукт реакции визуализировали добавлением АВТС («Sigma», США) (0,5 мг/мл) в 50 мМ цитратном буфере (рН 7,5) и 0,05 %-й H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцию останавливали, добавляя 0,3 % азида Na в цитратном буфере (рН 7,5) и результат ее обсчитывали количественно на «Multiscan» («Titertek», Финляндия — Англия).

Иммуноблоттинг. Белки лизатов тканей разделяли электрофоретически в градиентном (7—22 %) полиакриламидном геле в присутствии DS-Na [5] (пластины 9×12 см, толщина геля 1 мм), на дорожку наносили 100 мкг суммарного белка. После этого белки переносили на нитроцеллюлозные фильтры BA-85 («Schleicher und Schüll», Германия) методом пассивного переноса. Далее иммуноблоттинг проводили, как описано ранее [2].

**Результаты и обсуждение.** Результаты, представленные в таблице, показывают распределение СерРС в тканях высших эукариот — от рыб до человека. Видно, что наибольшее содержание СерРС (в пересчете

*Распределение СерРС в органах позвоночных по данным метода ELISA (ОД<sub>405</sub> на 100 мкг суммарного белка)*

Объект исследования	Отряд (подотряд)	Печень	Сердце	Почки	Мозг	Поджелудочная железа
Бык	Парнокопытные (жвачные)	2,440±0,041	—	—	1,045±±0,016	0,643±±0,0216
Кролик	Грызуны (зайцеобразные)	2,545±0,007	1,906±±0,086	2,280±0,048	1,722±±0,025	1,945±0,072
Мышь	Грызуны	1,216±0,046	0,946±±0,045	1,173±0,027	1,244±±0,045	—
Курица	Куриные	0,709±0,003	—	—	—	—
Карп	Карповые	0,402±0,054	—	—	—	—
Человек	Приматы	2,651±0,091	0,527±±0,077	—	—	—
Контроль						
	Высокоочищенный препарат СерРС печени быка		1,399±±0,048			
	То же печени кролика		1,237±±0,011			
	Триптофанил-тРНК синтетаза поджелудочной железы быка		0,050±±0,028			
	Лакказа		0,079±±0,014			

Примечание. В каждом случае приведены средние значения из пяти определений.

на одинаковое количество суммарного белка) отмечалось в печени исследуемых организмов, достигающее максимальных значений у кролика (представитель отряда грызунов), быка (отряд парнокопытных) и человека (отряд приматов). Высокое содержание СерРС в печени и почках кролика коррелирует с известными физиологическими данными о высоком уровне метаболизма в данных органах, обусловленного их защитно-выводящей функцией. В качестве положительного контроля использовали высокоочищенные препараты СерРС печени быка и печени кролика, в качестве отрицательного — высокоочищенные препараты

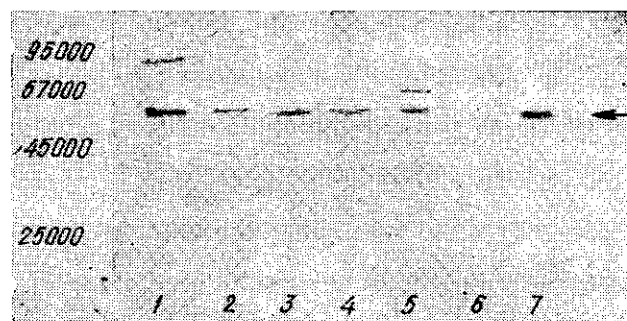


Рис. 1. Иммунохимическое изучение распределения СерРС в различных органах представителя позвоночных (кролика). Иммуноблотинг супернатантов (0,1 мг суммарного белка) после центрифугирования клеточных лизатов при 30 000 *g* (1 — печень; 2 — сердце; 3 — почки; 4 — поджелудочная железа; 5 — мозг кролика), а также высокоочищенных препаратов триптофанил-тРНК синтетазы поджелудочной железы быка (6). СерРС печени кролика (7) с моноспецифическими поликлональными антителами к СерРС печени быка. Здесь и на рис. 2 положение маркеров указано слева, субъединицы высокоочищенного препарата СерРС — справа

триптофанил-тРНК синтетазы поджелудочной железы быка и грибного фермента лакказы. Видно, что антитела к СерРС печени быка не взаимодействуют ни с триптофанил-тРНК синтетазой, ни с лакказой, что указывает на высокую специфичность полученных антител. Возможность применения моноспецифических поликлональных антител к СерРС печени быка для перекрестных экспериментов на других представителях высших эукариот показана нами в предыдущих исследованиях по иммунохимическому перекресту СерРС из различных организмов [2].

На рис. 1 представлены результаты иммунохимического изучения распределения СерРС в различных органах представителя высших эукариот. Видно, что в лизатах всех органов кролика обнаруживается основная полоса с подвижностью, соответствующей таковой у высокоочищенного препарата СерРС печени кролика (дорожка 7). Не отмечено никакого взаимодействия с высокоочищенным препаратом триптофанил-тРНК синтетазы (дорожка 6). Наиболее интенсивны полосы, проявляемые в лизате печени кролика, что соответствует и данным иммуноферментного анализа. В некоторых случаях моноспецифические поликлональные антитела проявляют полосы с м. м. выше, чем соответствующие подвижности субъединицы высокоочищенного препарата СерРС: это может объясняться существованием высокомолекулярных комплексов синтетаз с другими белками в лизатах органов, которые весьма устойчивы к протеолизу и даже воздействию детергентов [6, 7].

На рис. 2 приведены данные по исследованию распределения СерРС в печени различных представителей класса позвоночных (от рыб до человека) методом иммуноблотинга. Видно, что во всех случаях проявляется основная полоса с м. м. около 64 000, что соответствует подвижности субъединицы СерРС печени быка (дорожка 7). Наличие проявляемых полос с большей молекулярной массой, как и в предыдущем эксперименте, можно объяснить существованием СерРС в клетке в составе прочных макромолекулярных комплексов. Такие комплексы

можно получить как при определенных условиях гомогенизации тканей [8, 9], так и независимо от этих условий, что отмечалось ранее в некоторых работах. Наиболее интенсивно данные комплексы проявляются у кроликов (отряд зайцеобразных), отличающихся высокой степенью метаболизма и уровнем биосинтеза белка именно в печени.

Иммунохимический подход к исследованию распределения ферментов в различных органах и тканях высших эукариот позволяет определить не только относительное количественное содержание интересующего нас белка, но и молекулярную массу субъединиц фермента, не очи-

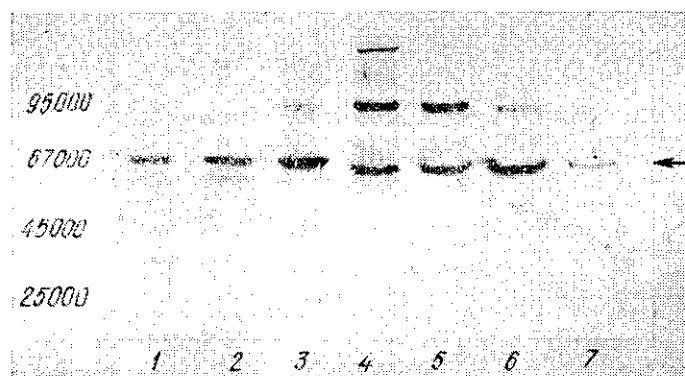


Рис. 2. Изучение распределения СерРС в печени различных представителей позвоночных. Иммуноблоттинг клеточных лизатов (супернатант, 30 000 g, 100 мкг суммарного белка) с моноспецифическими поликлональными антителами к СерРС печени быка (1 — печень рыбы; 2 — печень курицы; 3 — печень мыши; 4 — печень кролика; 5 — печень быка; 6 — печень человека; 7 — высокоочищенный препарат СерРС печени быка)

щая его до гомогенного состояния. Это весьма существенно для аминоксил-тРНК синтетаз высших эукариот, так как имеющиеся на сегодняшний день методы их очистки до гомогенного состояния очень трудоемки и малоэффективны.

Изучение распределения аминоксил-тРНК синтетаз в различных органах и тканях, сравнение количества белка, определяемого иммунохимическими методами, с уровнем его ферментативной активности важны и с точки зрения дальнейшего исследования нетрадиционных (так называемых неканонических) функций данного класса ферментов [10—12]. Хорошим примером тому могут служить результаты определения значительных межвидовых отличий в содержании триптофанил-тРНК синтетазы в различных организмах [10]. Наряду с уже известными неканоническими функциями для некоторых синтетаз, такими как синтез Ар:А [11], участие в сплайсинге [12], в регуляции инициации трансляции [13], не исключено, что мы сможем обнаружить и новые функции этих ферментов.

Авторы выражают благодарность Г. К. Ковалевой (ИМБ РАН им. Энгельгардта, Москва) за предоставленный препарат триптофанил-тРНК синтетазы; О. В. Скоробогатько (Ин-т биохимии им. Баха, Москва) — за предоставленный препарат лакказы.

**Summary.** The immunochemical approach to the study of enzyme distribution in eukaryotes (in different organs and tissues) gives a possibility to determine not only quantity of the protein but the molecular weight of the subunit without purification. The study of aminoacyl-tRNA synthetases distribution in different organs and tissues, comparison of the protein quantity determined by immunochemical methods with the enzyme activity is important for the study of so-called uncanonic functions of this class enzymes.

We have studied the distribution of SerRS in organs and tissues of the different species of Vertebrates by immunochemical methods. It is shown that the highest SerRS level is observed in the liver (from fish to humans). SerRS partially exists in the form of high-molecular complex that is stable in the lysates even under denaturing conditions.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудзера О. И., Сидорик Л. Л., Золотухина И. М. и др. Исследование серил-тРНК синтетазы быка иммунохимическими методами // Биополимеры и клетка.—1990.— 6.— С. 105—107.
2. Sidorik L. L., Gudzera O. I., Dragovoz V. A. et al. Immunochemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // FEBS Lett.—1991.— 292.— P. 76—78.
3. Киселева Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.— 408 с.
4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem.—1976.— 72.— P. 248—254.
5. Laemmli U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.— 227.— P. 670—675.
6. Dang C. V., Dang C. V. Higher eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases in physiologic and pathologic states // Mol. and Cel. Biochem.—1986.— 71.— P. 107.
7. Mirande M., Gache Y., Le Corre D., Waller J.-P. Seven mammalian aminoacyl-tRNA synthetases copurified as high molecular weight complexes are associated within the same complex // EMBO J.—1982.— 1.— P. 733.
8. Kellerman O., Brevet A., Tonetti H., Waller J.-P. Macromolecular complexes of aminoacyl-tRNA synthetases from eukaryotes. 1. Extensive precipitation and characterization of the high-molecular weight complexes of seven aminoacyl-tRNA synthetases from sheep liver // Eur. J. Biochem.—1979.— 99.— P. 541.
9. Yang D. C. H., Garcia J. V., Johnson Y. D., Wahab S. Multienzyme complexes of mammalian aminoacyl-tRNA synthetases // Curr. Top. Cel. Regul.—1985.— 26.— P. 325.
10. Киселева Л. Л. Аминоацил-тРНК синтетазы (кодазы) и их неканонические функции // Молекуляр. биология.—1990.— 24.— С. 1445.
11. Wahal S. Z., Yang D. C. H. Synthesis of diadenosine 5'-5'''-P<sup>1</sup>-P<sup>4</sup>-tetraphosphate by lysyl-tRNA synthetase and a multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver // J. Biol. Chem.—1985.— 260.— P. 5281.
12. Majumder A. L., Akins R. A., Wilkincon J.-G. et al. Involvement of tyrosyl-tRNA synthetase in splicing of group 1 introns in *Neurospora crassa* mitochondria: Biochemical and immunochemical analysis of splicing activity // Mol. and Cell. Biol.—1989.— 9.— P. 2089.
13. Pollard J. W., Galprine A. R., Clemens M. J. A novel role for aminoacyl-tRNA synthetases in the regulation of polypeptide chain initiation // Eur. J. Biochem.—1989.— 182.— P. 1.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 22.05.92

УДК 577.217:616.127

**Т. К. Машанаускас, Л. Л. Иванов, Г. А. Родовичюс,  
Л. Ю. Лукошявичюс, А. К. Прашкявичюс**

#### **БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ ИЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА**

*Изучен уровень биосинтеза белка в бесклеточных системах из печени кролика в норме и через 12 ч после воспроизведения экспериментальной ишемии миокарда (ЭИМ). Показано, что повышение уровня включения [<sup>14</sup>C] лейцина в продукт трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе при ЭИМ связано с увеличением активности аминоацил-тРНК синтетаз. Электрофоретический анализ продуктов трансляции с последующей автордиографией указал на перераспределение при ЭИМ в спектре синтезируемых в бесклеточной системе белков.*

© Т. К. Машанаускас, Л. Л. Иванов, Г. А. Родовичюс, Л. Ю. Лукошявичюс,  
А. К. Прашкявичюс, 1992