

Henryk BERBEĆ, Alicja PASZKOWSKA

Wielkocząsteczkowe postacie syntetaz aminoacylo-tRNA w organizmach zwierzęcych. Część I. Wielkość i skład enzymatyczny wielkocząsteczkowego kompleksu syntetazowego z cytosolu wątroby królika

High-Molecular Weight Forms of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Animal Organisms.
Part I. Size and Enzymatic Composition of the High-Molecular-Weight Synthetase Complex from Rabbit Liver Cytosol

WSTĘP

Syntetazy aminoacylo-tRNA należą do najważniejszych elementów komórkowej maszyny syntetyzującej białko. Stwierdzono, że w niektórych organizmach występują wielkocząsteczkowe kompleksy syntetazowe, które zawierają obok syntetaz aminoacylo-tRNA także inne białka oraz składniki nie będące białkami (1). W oczyszczonych preparatach kompleksów otrzymanych z wątroby królika, szczura i owcy znajdowano 7—9 syntetaz aminoacylo-tRNA (2—4). Na podstawie doświadczeń prowadzonych w naszej pracowni (5) można sądzić, że opisywane (1, 3, 4) oczyszczone kompleksy nie mają cech natywnych, choć funkcjonują w komórce, lecz są tworami zniekształconymi na skutek degradacji zachodzącej w trakcie czyszczenia.

Celem badań było scharakteryzowanie natywnego kompleksu syntetazowego z cytosolu wątroby królika, otrzymanego z zastosowaniem możliwie najłagodniejszych technik preparacyjnych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania prowadzono na królikach (samicach rasy „francuski szampański”). Przygotowanie materiału, chromatografię typu sita molekularnego, oznaczanie aktywności enzymów i stężenia białka przeprowadzono w sposób opisany wcześniej (6). Wirowanie w gradiencie gęstości glicerolu wykonywano według Martina i Ames (7). Do kalibracji kolumn chromatograficznych użyto następujących wzorców (stosowanych oddzielnie): ferrytyny — Mr = 450 000, katalazy — Mr = 240 000, albuminy surowicy wołowej — Mr = 67 000, hemoglobiny — Mr = 68 000 oraz 2,4-dinitrofenolu (do wyznaczenia objętości roboczej kolumn).

Procentową aktywność danej syntetazy skompleksowanej (PC) w odniesieniu do aktywności całkowitej w cytosolu obliczano na podstawie zawartości białka we frakcji wielkocząsteczkowej eluatu z kolumny (6) według następującego wzoru:

$$PC = \frac{H \times Bh}{C}$$

gdzie H — aktywność właściwa we frakcji wielkocząsteczkowej, Bh — procentowa zawartość białka we frakcji wielkocząsteczkowej, C — aktywność całkowita w cytosolu.

Do badań używano odczynników wysokiej czystości zgodnie z tym, co podano wcześniej (6).

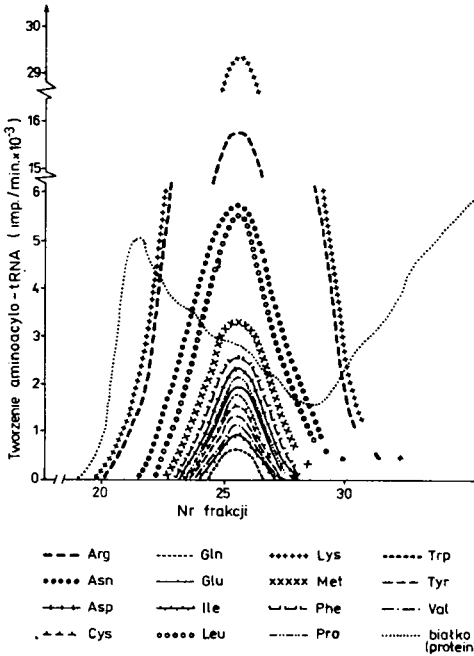
Radioizotopy. Aminokwasy firmy The Radiochemical Centre, Amersham: L-U[¹⁴C] asparagina, glutamina, metionina, L-[¹⁴C] metylenotryptofan, aktywność właściwa 50 Ci/mol oraz L-U[¹⁴C] chlorowoderek cysteiny, aktywność właściwa 27 Ci/mol. Pozostałe aminokwasy L-U[¹⁴C], aktywność właściwa 50—240 Ci/mol — firmy UVVVR, Czechosłowacja.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przed przystąpieniem do prezentowanych badań przeprowadzono próby mające na celu znalezienie najłagodniejszej techniki umożliwiającej otrzymanie kompleksów syntetazowych. Wypróbowano chromatografię na różnych żelach polisacharydowych, wirowanie w gradiencie gęstości glicerolu i sacharozy oraz precypitację z użyciem glikolu polietylenowego. Sączenie przez kolumny z żelom Bio-Gel A-5m okazało się techniką najbardziej przydatną (dokumentacji nie przytoczono).

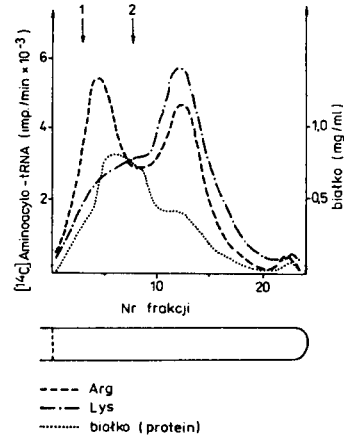
W wyniku sączenia cytosolu z wątroby królika przez kolumny agarozowe Bio-Gel A-5m otrzymuje się dwa szczyty aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA (6). Pierwszy szczyt aktywności wskazuje miejsce elucji kompleksu syntetazowego, drugi wyznacza miejsce elucji enzymów wolnych. Analizując profile elucji wszystkich 20 syntetaz w pierwszym szczycie aktywności znaleziono aktywność 15 enzymów (ryc. 1). Na uwagę zasługuje w pełni symetryczne rozłożenie oznaczanych aktywności. Symetryczny rozkład aktywności syntetaz jest dowodem na to, że enzymy te znajdują się w jednym kompleksie. Na podstawie wzorców użytych do kalibracji kolumny wielkość eluowanego kompleksu syntetazowego z wątroby królika można ocenić na ok. 4000 kDa. Szczyty elucji wolnych syntetaz arginylo- i lizylo-tRNA z cytosolu wątroby królika odpowiadały masom ok. 60 i 120 kDa. Wielkości te są zbliżone do danych podawanych w piśmiennictwie dla bakterii, drożdży i ssaków (8).

W wyniku wirowania cytosolu z wątroby królika w liniowym gradiencie gęstości glicerolu według Martina i Amesa (7) uzyskano frakcje białkowe, wśród których syntetazy aminoacylo-tRNA tworzą dwa szczyty aktywności (ryc. 2). Wśród 24 frakcji, odbieranych od góry próbówki po wirowaniu, na początku znajdują się białka o niskiej gęstości. Wśród nich obserwuje się wyraźny szczyt aktywności syntetazy arginylo-tRNA i szczątkową aktywność syntetazy lizylo-tRNA. Wśród białek o wysokiej gęstości widoczne są wyraźne,



Ryc. 1. Syntetazy aminoacylo-tRNA z cytosolu wątroby królika eluowane z kolumny Bio-Gel A-5m w obszarze białek wielkocząsteczkowych (6). Na kolumnę ($2,6 \times 42$ cm) podawano 2 ml cytosolu (54 mg białka). W eluowanych frakcjach (3,1 ml) oznaczano białko oraz aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA

Aminoacyl-tRNA synthetases of rabbit liver cytosol eluted from the Bio-Gel A-5m column in the high-molecular-weight protein region (6). 2 ml (54 mg protein) of cytosol was applied on the column (2.6×42 cm). In the eluted fractions (3.1 ml), protein and aminoacyl-tRNA synthetase activities were determined



Ryc. 2. Właściwości sedymentacyjne syntetaz aminoacylo-tRNA z cytosolu wątroby królika. Próbkę cytosolu (0,1 ml, 3 mg białka) nanoszono na liniowy gradient stężenia glicerolu (5 ml, 10–30% glicerolu). Wirowano 10 godzin przy 35000 obr./min w wirówce VAC-602. W odbieranych od góry frakcjach (0,22 ml) oznaczano aktywność syntetaz aminoacylo-tRNA. Białka wzorcowe: 1 — BSA (4,5 S), 2 — katalaza (11,3 S)

Sedimentation properties of rabbit liver cytosol aminoacyl-tRNA synthetases. An aliquot (0.1 ml, 3 mg protein) was applied on the glycerol gradient (5 ml, 10–30% of glycerol). After 10 hrs of centrifugation (35000 rpm in the VAC-602 centrifuge). 0.22 ml portions of the supernatant were collected in which protein and aminoacyl-tRNA synthetase activities were determined. Protein standards: 1 — BSA (4.5 S), 2 — catalase (11.3 S)

pokrywające się szczyty aktywności obydwu syntetaz. Drugi szczyt aktywności wskazuje lokalizację kompleksu syntetazowego. Użyte wzorce pozwalają na przybliżoną ocenę stałej sedymentacji dla wolnej syntetazy arginylo-tRNA i dla kompleksu syntetazowego na kolejno ok. 7 S i ok. 19 S.

Wyniki oznaczeń aktywności wszystkich 20 syntetaz aminoacylo-tRNA we frakcjach eluatu z kolumny Bio-Gel A-5m cytosolu z wątroby królika zestawiono w tab. 1. W składzie kompleksu syntetazowego (pierwszy szczyt aktywności) znaleziono aktywności 15 syntetaz aminoacylo-tRNA: argynylowej,

Tab. 1. Aktywności całkowite syntetaz aminoacylo-tRNA oraz aktywności syntetaz skompleksowanych w cytosolu wątroby królika

Total activities of aminoacyl-tRNA synthetases and the activities of the complexed synthetases in rabbit liver cytosole

Syntetaza specyficzna dla amino- kwasu	Aktywność całkowita w cytosolu U/mg	Syntetazy skompleksowane*		
		H U/mg	PH %	PC %
Ala	31,1	0	0	0
Arg	174,9	455,7	21,1	42,7
Asn	64,9	166,3	7,7	42,0
Asp	21,7	65,7	3,0	49,7
Cys	10,0	38,3	1,8	62,8
Gly	45,7	0	0	0
Gln	10,8	52,0	2,4	79,0
Glu	11,4	53,4	2,5	76,8
His	4,6	0	0	0
Ile	21,7	28,2	1,3	21,3
Leu	45,1	159,7	7,4	58,1
Lys	150,8	824,6	38,2	89,7
Met	41,7	95,4	4,4	37,5
Phe	27,4	73,1	3,4	43,8
Pro	13,4	60,0	2,8	73,4
Ser	35,7	0	0	0
Thr	11,1	0	0	0
Trp	30,9	17,4	0,8	9,2
Tyr	20,6	38,3	1,8	30,5
Val	42,0	30,3	1,4	11,8

* H — aktywność właściwa we frakcji wielkocząsteczkowej eluatu. PH — procentowa aktywność danej syntetazy skompleksowanej w odniesieniu do sumy aktywności wszystkich syntetaz skompleksowanych. PC — procentowa aktywność danej syntetazy skompleksowanej w odniesieniu do aktywności całkowitej cytosolu. Frakcja wielkocząsteczkowa zawierała 16,4% białka cytosolu. Wyniki są średnimi z trzech pomiarów (odchylenie standardowe nie przekraczało 10%).

* H — specific activity in the high-molecular-weight fraction of the eluate. PH — percentage activity of the given complexed synthetase in the sum of activities of all complexed synthetases in cytosole. PC — percentage activity of the given complexed synthetase in the total cytosole activity. The high-molecular-weight fraction contained 16.4% of the cytosole protein. The results are mean values of three determinations (standard deviation did not exceed 10%).

asparaginylowej, asparaginowej, cysteinyłowej, glutaminyłowej, glutamyłowej, izoleucyłowej, leucyłowej, lizyłowej, metionyłowej, fenyloalanyłowej, prolilowej, tryptofanyłowej, tyrozyłowej i walilowej. Najwyższą aktywność w składzie kompleksu wykazywały syntetazy lizylo- i arginylo-, najniższą tryptofanylo- i izoleucylo-tRNA. Te dwa ostatnie enzymy obejmowały razem zaledwie ok. 2% aktywności całkowitej kompleksu. Wszystkie syntetazy, które znaleziono w składzie kompleksu syntetazowego, występowały także poza kompleksem w cytosolu. Najwyższy wskaźnik PC wykazywała syntetaza lizylo-tRNA — niemal 90% enzymu znajdowało się w kompleksie. Najniższy wskaźnik PC stwierdzono dla syntetaz tryptofanylo- i walilo-tRNA — tylko ok. 10%. Obok syntetazy

lizylo-tRNA dalszych 5 syntetaz występowało w większej części w postaci skompleksowanej niż wolnej. Były to syntetazy specyficzne dla glutaminy, kwasu glutaminowego, proliny, cysteiny i leucyny.

Najwyższą całkowitą aktywność w cytosolu z wątroby królika wykazywały syntetazy arginylo- i lizylo-tRNA. Aktywność ich przewyższała niemal 3-krotnie aktywność kolejnych syntetaz wykazujących wysokie aktywności. Najniższe aktywności stwierdzono dla syntetaz histydylo- i cysteinylo-tRNA.

Na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie enzymy, które znajdowano we frakcji wielkocząsteczkowej, występowały także poza tą frakcją jako enzymy wolne. W odniesieniu do niektórych syntetaz zdecydowana część ich aktywności znajdowała się we frakcji wielkocząsteczkowej (patrz PC dla syntetazy lizylo-tRNA). Brak jest jednomyślności co do ilości syntetaz aminoacylo-tRNA znajdujących się w natywnych kompleksach syntetazowych (1). W kompleksach nie oczyszczonych znajdowano więcej enzymów niż w kompleksach wysoko oczyszczonych. Z narządów królika (2), szczura (3) i owcy (4) otrzymywano oczyszczone preparaty kompleksów syntetazowych, w których znajdowano 7—9 syntetaz aminoacylo-tRNA. Nasze wcześniejsze badania (5) oraz sugestie niektórych autorów wskazują, że natywne kompleksy zbudowane są z liczby enzymów większej niż 9. Wyniki zaprezentowane obecnie wskazują, że natywny kompleks zawarty w cytosolu z wątroby królika obejmuje 15 syntetaz aminoacylo-tRNA.

Niektórzy (3, 9) wykrywali kilka różnych wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych w cytosolu z wątroby szczura. Doniesienia o istnieniu różnych postaci kompleksów syntetazowych w cytosolu wyższych zwierząt nie zostały przez nas potwierdzone (wykrywano tylko jeden kompleks syntetazowy). Wydaje się, że wykrywanie obok siebie różnych postaci kompleksów syntetazowych przez niektórych autorów było spowodowane nietrwałością kompleksów. Ich uszkodzone formy znajdowane w badanym materiale mogły sugerować wielopostaciowość kompleksów syntetazowych. W podjętych przez nas badaniach zachowywano szczególną ostrożność i stosowano wszystkie dostępne sposoby mające na celu zabezpieczenie kompleksów przed rozpadem i enzymów przed utratą aktywności (stosowano procedury łagodne i krótkotrwałe, a do roztworów dodawano inhibitory proteaz i czynniki chroniące grupy -SH białek).

PIŚMIENNICTWO

1. Berbeć H.: Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA. *Post. Biochem.* **36**, 41, 1991.
2. Mirande M. i wsp.: Sedimentation behaviour of aminoacyl-tRNA synthetase from mixed lysates of yeast and rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta* **747**, 71, 1983.
3. Dang C. V., Yang D. C. H.: Disassembly and gross structure of particulate aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver. *J. Biol. Chem.* **254**, 5350, 1979.

4. Brevet A. i wsp.: Macromolecular complexes of aminoacyl-tRNA synthetases from Eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* **99**, 551, 1979.
5. Berbeć H. i wsp.: Heavy and light forms of some aminoacyl-tRNA synthetases in fraction X, microsomes and cytosol of rabbit liver. *Mol. Cell. Biochem.* **62**, 149, 1984.
6. Berbeć H., Paszkowska A.: Comparison of the thermolability and hydrophobic properties of high- and low-molecular-weight forms of rabbit liver arginyl-tRNA synthetase. *Mol. Cell. Biochem.* **86**, 125, 1989.
7. Martin R. G., Ames B. N.: A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* **236**, 1372, 1961.
8. Joachimiak A., Barciszewski J.: Amino acid: tRNA ligases (EC 6.1.1.—). *FEBS Lett.* **119**, 201, 1980.
9. Vennegoor C. J. G. M. i wsp.: More evidence for a particle character of aminoacyl-transfer RNA synthetases isolated from rat liver. *J. Mol. Biol.* **65**, 375, 1972.

Otrzymano 1993.06.10.

SUMMARY

A high-molecular-weight complex composed of 15 amino acid-tRNA synthetases occurs in the rabbit liver cytosol apart from the free enzymes. The greatest activities in the complex are exhibited by lysyl- and arginyl-tRNA synthetases. The complex has the mass of about 4,000 kDa and the sedimentation constant about 19 S.