

Henryk BERBEĆ, Alicja PASZKOWSKA

**Wielkocząsteczkowe postacie syntetaz aminoacylo-tRNA w organizmach zwierzęcych. Część II. Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA w organizmach niższych zwierząt**

High-Molecular-Weight Forms of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Animal Organisms.  
Part II. High-Molecular-Weight Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes in Lower Animal Organisms

WSTĘP

W cytosolu organizmów zwierzęcych znaleziono wieloenzymatyczne wielkocząsteczkowe kompleksy zawierające syntetazy aminoacylo-tRNA (1). Kompleksy te wykrywano dotychczas jedynie w organizmach ssaków. W niższych organizmach (u *Prokaryota* czy w drożdżach) kompleksów syntetazowych nie znajdowano. Przypuszcza się, że kompleksy powstają dzięki wykształconej w toku ewolucji zdolności eukariotycznych syntetaz do asocjacji i do łączenia się z elementami strukturalnymi wnętrza komórki (2—4). Nie wiadomo, w jakim stadium rozwoju filogenetycznego organizmów pojawiły się skompleksowane postacie syntetaz.

Celem badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA występują także poza ssakami, w organizmach niższych zwierząt.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

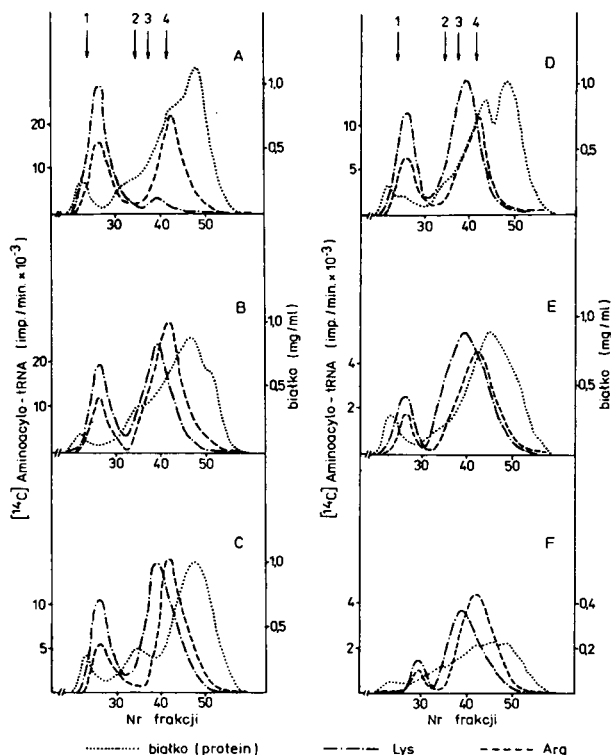
Badania prowadzono na zwierzętach będących przedstawicielami różnych gromad systematyki, mianowicie: A — na królikach (samicach rasy „francuski szampański”), B — na kurach domowych (samicach rasy „leghorn”), C — na żabach (przeważnie *Rana esculenta*), D — na karpach (*Cyprinus carpio*), E — na ślimakach ogrodowych (*Cepaea hortensis*), F — na pierwotniakach *Paramecium caudatum* i *Paramecium aurelia* (szczep 299S otrzymany z Zakładu Biologii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie). Pierwotniaki hodowano w kulturze aksenicznej według Solda i van Wagtenonka (5). Masę komórkową wydzielano w wyniku wirowania.

W przypadku zwierząt wymienionych w punktach A—D materiał do badań stanowiły wątroby wydobyte natychmiast po zabiciu zwierzęcia. W przypadku ślimaków i *Paramecium* zwierzęta homogenizowano w całości (ślimaki bez skorup). Homogenat *Paramecium* przygotowywano w ten sposób, że odwirowane komórki ucierano w moździerz porcelanowym z dodatkiem równej wagowo ilości drobnociarnistego korundu równoważonego uprzednio płynem H (6). W badaniach stosowano takie same odczynniki, materiały i metodykę, jak opisano wcześniej (6, 7). Do oznaczania aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA we frakcjach otrzymanych po wirowaniu w gradiencie gęstości glicerolu używano mieszaniny reakcyjnej, która zawierała zamiast jednego aminokwasu 0,5  $\mu$ Ci jednakowych ilości następujących [ $^{14}$ C] aminokwasów: argininy, glutaminy, kwasu glutaminowego, izoleucyny, leucyny, lizyny i metioniny.

## WYNIKI

W wyniku sączenia cytosolu przez kolumny Bio-Gel A-5m uzyskiwano dwa szczyty aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA. Pierwszy szczyt zawierał kompleks syntetazowy, drugi — syntetazy wolne (6). Profile elucji syntetaz arginylo- i lizylo-tRNA, uzyskane w wyniku chromatograficznego rozdzielania składników cytosolu badanych zwierząt: kury (B), karpia (C), żaby (D), ślimaka (E) i *Paramecium* (F), przedstawiono na ryc. 1, porównując je z profilami elucji dla cytosolu z wątroby królika (ryc. 1A). Wymienione enzymy są syntetazami, których aktywności były dość wysokie we wszystkich badanych przez nas organizmach zwierzęcych, występowały one zawsze w składzie kompleksów syntetazowych i były stosunkowo odporne na zabiegi preparacyjne (6, 8, 9). Profile elucji syntetaz z cytosolu wątroby kury są podobne do odpowiednich profilów dla cytosolu z wątroby królika: lokalizacja szczytów aktywności w obszarze wielkocząsteczkowych białek i w obszarze enzymów wolnych jest taka sama (ryc. 1B). Dostrzegalną różnicę stanowi występowanie w wątrobie kury znacznej części badanych enzymów w postaci wolnej, co jest szczególnie widoczne w odniesieniu do syntetazy lizylo-tRNA. Miejsce elucji pierwszego szczytu (kompleks syntetazowy) odpowiada masie ok. 4000 kDa, miejsce elucji drugiego szczytu odpowiada 120 kDa dla syntetazy lizylo-tRNA i 60 kDa dla syntetazy arginylo-tRNA.

Wykresy elucji uzyskane podczas chromatograficznego rozdzielania składników cytosolu z wątroby karpia (ryc. 1C) wykazują duże podobieństwo do wyników otrzymanych dla wątroby kury. Szczyty aktywności zlokalizowane są tak samo, ponadto znaczne ilości obydwu badanych enzymów występują w postaci niskocząsteczkowej. Obydwie badane syntetazy z cytosolu wątroby żaby (ryc. 1D) wykazują profile elucji podobne do otrzymanych dla enzymów z wątroby karpia i kury. Lokalizacja szczytów aktywności jest identyczna. Podobną jak wyżej lokalizację w eluacie z kolumny wykazują też szczyty aktywności syntetaz arginylo-tRNA i lizylo-tRNA z cytosolu ślimaka (ryc. 1E). Na uwagę zasługuje fakt, że enzymy występują głównie w postaci wolnej. Jedynie



Ryc. 1. Profile elucji z kolumn Bio-Gel A-5m syntez aminoacylo-tRNA zawartych w cytosolu różnych zwierząt. Na kolumny (2,6 × 42 cm) podawano 2 ml cytosolu: A — wątroby królika (54 mg białka), B — wątroby kury (46 mg białka), C — wątroby karpia (49 mg białka), D — wątroby zaby (48 mg białka), E — ślimaka (44 mg białka), F — *Paramecium* (21 mg białka). W zbieranych frakcjach (3,1 ml) oznaczano stężenie białka oraz aktywność syntez arginylo- i lizylo-tRNA. Strzałki pokazują miejsca elucji wzorców użytych do kalibracji kolumny: 1 — dekstranu błękitnego, 2 — ferrytyny, 3 — katalazy, 4 — BSA

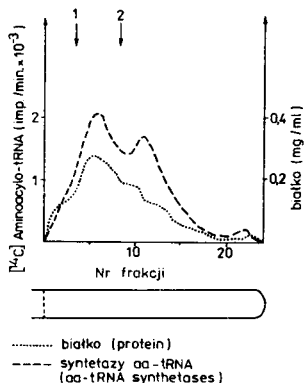
Profiles of elution of cytosol aminoacyl-tRNA synthetases of various animals from Bio-Gel A5m columns. 2 ml portions of cytosole: A — rat liver (54 mg protein), B — hen liver (46 mg protein), C — carp liver (49 mg protein), D — frog liver (48 mg protein), E — snail (44 mg protein), F — *Paramecium* (21 mg protein) were applied on the column (2.6 × 42 cm). In the collected fractions (3.1 ml) — protein, arginyl- and lysyl-tRNA synthetase activities were determined. The arrows show the elution of standards used for the column calibration: 1 — blue dextran, 2 — ferritin, 3 — catalase, 4 — BSA

niewielka część aktywności znajdująca jest w pierwszym szczycie, znaczącym miejsce elucji kompleksu.

Aktywności syntez arginylo-tRNA i lizylo-tRNA pochodzących z cytosolu komórek *Paramecium* pojawiają się w eluacie w postaci dwóch szczytów: jednego w obszarze białek wielkocząsteczkowych, drugiego w miejscu elucji enzymów wolnych (ryc. 1F). Widoczne jest jednak znaczne przesunięcie pierwszego szczytu

w kierunku niższej masy cząsteczkowej, odpowiadającej ok. 1600 kDa. Jedynie mała część badanych enzymów występuje w pierwszym szczycie, a więc w postaci skompleksowanej.

W wyniku wirowania cytosolu otrzymanego z komórek *Paramecium* w gradiencie gęstości glicerolu uzyskiwano dwa szczyty aktywności syntez aminoacylo-tRNA (ryc. 2). Lokalizacja pierwszego szczytu odpowiada białku o stałej sedymentacji ok. 8 S, drugiego szczytu — ok. 15 S (oceniana na podstawie użytych wzorców). Szczyty wyraźnie się zaznaczają, nie są jednak wystarczająco rozsunięte, aby rozdzielenie aktywności można uznać za satysfakcjonujące. Trzeci, szczątkowy szczyt aktywności zlokalizowany przy dnie próbówki pokrywał się z niewielkim szczytem zagregowanego białka.



Ryc. 2. Właściwości sedymentacyjne syntez aminoacylo-tRNA z cytosolu *Paramecium*. Próbkę cytosolu (0,1 ml, 1,1 mg białka) nanoszono na liniowy gradient stężenia glicerolu (5 ml, 10—30% glicerolu). Wirowano 10 godzin przy 35 000 obr./min w wirówce VAC-602. W odbieranych od góry frakcjach (0,22 ml) oznaczano stężenie białka oraz aktywność syntez aminoacylo-tRNA. Jako wzorców użyto 1 — BSA (4,5 S), 2 — katalazy (11,3 S)

Sedimentation properties of *Paramecium* cytosol aminoacyl-tRNA synthetases. An aliquot (0.1 ml, 1.1 mg protein) was applied on the glycerol gradient (5 ml, 10—30% glycerol). After 10 hrs of centrifugation (35,000 rpm in the VAC-602 centrifuge), 0.22 ml portions of the supernatant were collected in which protein and aminoacyl-tRNA synthetase activity were determined. BSA, 4.5 S (1) and catalase 11.3 S (2) were used as standards

Wyniki oznaczeń aktywności wszystkich 20 syntetaz aminoacylo-tRNA w cytosolu badanych zwierząt zestawiono w tab. 1. Obok aktywności całkowitych podano aktywności występujące we frakcjach wielkocząsteczkowych cytosolu (6). Wyniki wskazują, że w cytosolu wszystkich badanych zwierząt występują syntetazy wielkocząsteczkowe (skompleksowane). We frakcji wielkocząsteczkowej cytosolu kury stwierdzono aktywności 15 syntetaz aminoacylo-tRNA specyficznych dla: Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr i Val. W składzie kompleksu syntetazowego żaby, karpia i ślimaka znaleziono aktywności 13 syntetaz: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr i Val. W cytosolu *Paramecium* we frakcji wielkocząsteczkowej cytosolu stwierdzono aktywności 11 syntetaz: Arg, Asp, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr. Najwyższe aktywności wśród wielkocząsteczkowych syntetaz u kręgowców wykazywały syntetazy specyficzne dla argininy i lizyny, a u badanych zwierząt prymitywnych miejsce syntetazy arginylowej zajęła syntetaza glutaminianowa w cytosolu ślimaka i syntetaza izoleucynowa w cy-

tosolu *Paramecium*. Wszystkie enzymy, które znajdowano we frakcjach wielkocząsteczkowych, występowały także poza tymi frakcjami, jako enzymy wolne. W odniesieniu do niektórych syntetaz, zdecydowana część ich aktywności znajdowała się we frakcji wielkocząsteczkowej.

## DYSKUSJA

Najwyższą całkowitą aktywność w cytosolu wykazywały syntetazy arginylo- i lizylo-tRNA. W miarę przechodzenia od ssaków do zwierząt bardziej prymitywnych zauważono zmniejszanie się aktywności poszczególnych syntetaz, tak nisko- jak i wysokocząsteczkowych. Najniższe aktywności wśród syntetaz wielkocząsteczkowych zwierząt prymitywnych wykazywały syntetazy walilowa i glutamylowa u ślimaka oraz glutaminylova i glutamylowa u *Paramecium*.

Jak wspomniano we wstępie, dotychczas kompleksy syntetazowe wykrywane były prawie wyłącznie w organizmach ssaków. Nasze badania wskazują, że wielkocząsteczkowe postacie syntetaz obecne są również w cytosolu niższych zwierząt, w tym nawet tak prymitywnych, jak pierwotniaki. Z przedstawionych danych wynika, że aktywności syntetaz obecne są we frakcjach wielkocząsteczkowych cytosolu wszystkich badanych zwierząt (ryc. 1, tab. 1).

Masa cząsteczkowa kompleksów syntetazowych oceniana na podstawie objętości elucyjnych wynosiła ok. 4000 kDa dla kompleksów pochodzących od pierwszych 5 zwierząt i ok. 1600 kDa dla kompleksu z cytosolu *Paramecium*. Podobnie różniły się stałe sedymentacji, oceniane na podstawie wirowania w gradiencie gęstości glicerolu, które wynosiły ok. 19 S dla kompleksu z cytosolu wątroby królika (7) i ok. 15 S dla kompleksu z cytosolu *Paramecium* (ryc. 2). Według danych uzyskanych wcześniej (1), wielkość dotychczas badanych kompleksów wahała się najczęściej w granicach 1000—6000 kDa lub 12—25 S. Różnice w podawanych przez niektórych autorów (2—4) wartościach mogły być spowodowane nietrwałością kompleksów. W przedstawionych badaniach zastosowano łagodny sposób oddzielania kompleksów syntetazowych od syntetaz wolnych, co umożliwiło ocenę wielkości natywnych kompleksów.

Szczyty elucji wolnych syntetaz arginylo- i lizylo-tRNA z cytosolu wszystkich badanych zwierząt były jednakowo zlokalizowane i odpowiadały masom ok. 60 i 120 kDa. Wielkości te okazały się zbliżone do danych podawanych dla bakterii, drożdży i ssaków (10). Stała sedymentacji dla wolnej syntetazy arginylo-tRNA z cytosolu wątroby królika wynosiła ok. 7 S (7). W przypadku cytosolu *Paramecium* oceniano wartość stałej sedymentacji dla mieszaniny wolnych syntetaz (ryc. 2) i uzyskano wynik ok. 8 S, która to wielkość mieści się w zakresie podawanym dla wolnych syntetaz ssaków (11, 12).

Na podstawie uzyskanych danych (ryc. 1 i tab. 1) można stwierdzić, że w kompleksach pochodzących prawie od wszystkich (z wyjątkiem *Paramecium*)

Tab. 1. Aktywności całkowite syntetaz aminoacylo-tRNA oraz aktywności syntetaz skompleksowanych w cytosolu różnych niższych zwierząt

Total activities of aminoacyl-tRNA synthetases and the activities of the complexed synthetases in the cytosole of various lower animals

Syntetaza specyficzna dla amino- kwasu	Aktywność (U/mg)									
	Kura		Żaba		Karp		Ślimak		<i>Paramecium</i>	
	C	H	C	H	C	H	C	H	C	H
Ala	337,3	0	43,4	0	49,2	0	12,4	0	12,4	0
Arg	350,9	449,5	76,8	257,3	190,0	187,8	91,7	71,6	82,7	48,2
Asn	292,0	20,8	80,2	86,6	162,1	56,6	58,2	59,2	49,2	0
Asp	102,1	266,1	34,8	46,8	76,3	27,7	5,8	22,4	33,8	18,0
Cys	18,9	22,0	23,7	0	22,7	0	10,4	0	11,1	0
Gly	214,2	0	44,4	0	164,2	0	14,3	0	12,9	0
Gln	98,7	342,0	23,6	94,4	64,3	27,4	28,7	102,3	16,2	8,6
Glu	54,8	252,1	12,9	41,7	23,9	6,9	13,6	15,8	13,4	12,2
His	24,9	0	33,6	0	14,8	0	9,8	0	13,8	0
Ile	308,0	449,2	120,1	66,8	137,1	63,6	17,3	61,4	18,6	65,1
Leu	164,1	261,4	138,3	74,7	77,6	58,8	12,7	67,6	15,1	48,5
Lys	288,5	555,8	173,8	496,6	229,1	290,1	121,2	106,8	51,0	51,3
Met	173,3	258,3	109,4	102,5	110,2	102,3	25,4	24,4	39,6	48,3
Phe	68,8	103,1	27,7	36,2	94,6	24,8	15,2	39,0	14,0	43,8
Pro	64,9	99,7	20,9	0	9,9	0	23,3	0	13,9	0
Ser	229,1	0	78,4	0	135,2	0	26,2	0	10,7	0
Thr	70,7	0	28,8	0	30,7	0	34,4	0	12,6	0
Trp	103,2	34,8	88,2	223,0	85,8	41,7	96,2	33,3	16,9	31,8
Tyr	71,8	52,1	21,6	89,8	65,9	13,9	22,3	28,4	11,4	33,2
Val	36,9	55,0	55,6	86,3	146,1	54,6	35,4	14,8	11,6	0

Objaśnienia: C — aktywność całkowita w cytosolu, H — aktywność właściwa we frakcji wielkocząsteczkowej cytosolu (6).

Explanation: C — total activity in cytosole, H — specific activity in the high-molecular-weight cytosole fraction (6).

badanych zwierząt najwyższe aktywności wykazywała syntetaza lizylo-tRNA. W cytosolu wątroby królika prawie 90% aktywności tego enzymu skupione było w kompleksie (6). W cytosolu badanych zwierząt (tab. 1) aktywność syntetazy lizylo-tRNA poza kompleksem przewyższała znacznie aktywność enzymu skompleksowanego. Było to szczególnie widoczne w odniesieniu do zwierząt niższych: ślimaka i *Paramecium*. Ponadto w grupie badanych zwierząt stwierdzano zmniejszanie się aktywności poszczególnych syntetaz zarówno wolnych, jak i skompleksowanych w miarę przechodzenia od ssaków do zwierząt bardziej prymitywnych. Najniższe aktywności całkowite w cytosolu wykazywały syntetazy arginylo- i lizylo-tRNA.

Opierając się na zgromadzonych do tej pory informacjach o strukturze syntetaz aminoacylo-tRNA różnych organizmów, można sądzić, że jest bardzo prawdopodobne, iż w toku ewolucji organizmów dochodziło do stopniowych zmian w budowie polipeptydów syntetazowych, co wpływało na właściwości tych enzymów. Uzyskane przez nas wyniki, dotyczące stopniowych zmian

w budowie i właściwościach kompleksów, potwierdzają koncepcję, że zdolność do tworzenia kompleksów ma swoje źródło w zmianach ewolucyjnych w obrębie syntetaz. Koncepcję taką przedstawił Mirande i wsp. (13), a następnie potwierdzili inni (2, 4, 14). Stopniowe zmiany obserwowane wśród kompleksów syntetazowych badanych przez nas zwierząt są niewątpliwie wynikiem ewolucji w obrębie składników budujących kompleksy. Niestety, brak podobnych informacji o strukturze pierwszorzędowej syntetaz aminoacylo-tRNA zwierząt, takich jak karp, żaba, kura, ślimak i *Paramecium*, uniemożliwia poparcie naszych przypuszczeń.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań, a także doniesień wielu autorów można wysnuć przypuszczenie, że kompleksy syntetazowe pojawiają się wraz z powstaniem pierwszych organizmów zwierzęcych i występują powszechnie w świecie zwierząt.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Berbeć H.: Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA. *Post. Biochem.* **36**, 41, 1991.
2. Deutscher M. P.: The eucaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex: suggestions for its structure and function. *J. Cell. Biol.* **99**, 373, 1984.
3. Dang C. V. i wsp.: Association of methioninyl-tRNA synthetase with detergent-insoluble components of the rough endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **96**, 1138, 1983.
4. Cirakoglu B. i wsp.: A model for the structural organization of aminoacyl-tRNA synthetases in mammalian cells. *FEBS Lett.* **183**, 185, 1985.
5. Soldo A. T., van Wagtenonk W. J.: The nutrition of *Paramecium aurelia* strain 2995. *J. Protozool* **16**, 500, 1969.
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. Berbeć H., Paszkowska A.: Wielkocząsteczkowe postacie syntetaz aminoacylo-tRNA w organizmach zwierzęcych. Część I. Wielkość i skład enzymatyczny wielkocząsteczkowego kompleksu syntetazowego z cytosolu wątroby królika. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **48**, 29, 1993.
8. Gliński R. L. i wsp.: Evidence that lysyl and/or arginyl-tRNA synthetases from rat liver contain carbohydrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**, 1052, 1979.
9. Dang C. V. i wsp.: Interactions of aminoacyl-tRNA synthetases in the high molecular weight multienzyme complexes from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **829**, 319, 1985.
10. Joachimiak A., Barciszewski J.: Amino acid: tRNA ligases (EC 6.1.1—). *FEBS Lett.* **119**, 201, 1980.
11. 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.
12. Denney R. M.: Detection and partial purification of rapidly sedimenting forms of aminoacyl-tRNA synthetases from human placenta. *Arch. Biochem. Biophys.* **183**, 157, 1977.
13. Mirande M. i wsp.: Sedimentation behaviour of aminoacyl-tRNA synthetase frons of aminoacyl-tRNA synthetases from mixed lysates of yeast and rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta* **747**, 71, 1983.

14. Dang C. V., Dang C. V.: Multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases: an essence of being eukaryotic. *Biochem. J.* **239**, 249, 1986.

Otrzymano 1993.06.20.

#### SUMMARY

High-molecular-weight aminoacyl-tRNA synthetase complexes have been found in hen, frog and carp liver cytosol as well as in cytosol from snails and *Paramecium*. The complexes from vertebrates and snails contained 13—15 aminoacyl-tRNA synthetases, revealed mass of about 4,000 kDa and sedimentation constant about 19 S. The complex from *Paramecium* containing 11 aminoacyl-tRNA synthetases, revealed a mass of about 1,600 kDa and sedimentation constant 15 S. The results of the present study support the view that the high-molecular-weight synthetase complexes are common entities in the animal kingdom.