



УДК 547.962 : 577.156.1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫЕ ФОРМЫ ТРИПТОФАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ЭНДОГЕННОГО ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА **Прасолов В. С., Фаворова О. О., Киселев Л. Л.**Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР, Москва*

При действии протеаз поджелудочной железы на нативную ТРСазу из того же источника, состоящую из двух идентичных или близких к идентичности субъединиц с M 60 000, происходит расщепление каждой из субъединиц до полипептидных цепей с M 51 000 и 40 000. Модифицированные субъединицы остаются в ассоциированном состоянии и сохраняют ферментативную активность в гидроксаматном тесте, в реакциях АТР- ^{32}P -изотопного обмена и ацилирования тРНК.

ТРСаза (КФ 6.1.1.2) из поджелудочной железы быка состоит из двух субъединиц с M 60 000 каждая [1—3]. При анализе препаратов ТРСазы, очищенных разработанным ранее методом [3], электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях выявляется в большинстве случаев одна полоса, соответствующая субъединице с M 60 000 [3] (рис. 1, а). Однако было замечено, что в отдельных препаратах ТРСазы наряду с доминирующей полосой (M 60 000) обнаруживаются дополнительные полосы, имеющие M 51 000 и 40 000 (рис. 1, б, в). Существенно, что появление этих полос не сопровождается заметным уменьшением ферментативной активности препарата. С другой стороны, при протеолизе ТРСазы, вызванном обработкой трипсином, также обнаруживаются формы с M 40 000 и 51 000 [4]. Совпадение размеров цепей, найденных при контролируемом экзогенном гидролизе с теми размерами цепей, которые выявлены в отдельных препаратах нативного фермента, заставило нас предположить, что появление дополнительных полос при электрофорезе нативного фермента связано с ограниченным гидролизом последнего, осуществляемым эндогенными протеазами. Это предположение казалось правдоподобным в силу того, что поджелудочная железа, из которой выделялась ТРСаза, как известно, является органом, особенно богатым протеазами.

Цель этой работы состояла в изучении протеолиза ТРСазы под действием протеаз поджелудочной железы и сопоставлении полученного характера расщепления с тем, который мы ранее наблюдали при изучении ограниченного протеолиза под действием трипсина [4].

Эндогенный протеолиз ТРСазы можно было вызвать двумя способами: либо не добавляя ингибитор протеаз — ДФФ в процессе очистки фермен-

* Сокращения: ТРСаза — триптофанил-тРНК-синтетаза, ДФФ — диизопротил-фторфосфат; БСА — бычий сывороточный альбумин, ДСН — додецилсульфат натрия, ПААГ — полиакриламидный гель.

та [3], либо уже выделенный очищенный препарат подвергнуть действию экстракта из поджелудочной железы, который, как известно, характеризуется высоким уровнем протеолитической активности. Мы использовали оба подхода.

На рис. 2 показаны результаты опыта по центрифугированию препарата ТРСазы, выделенного без обработки ДФФ, в линейном градиенте концентрации сахарозы. Наблюдается один острый и симметричный пик активности ТРСазы как по гидроксаматному тесту, так и по способности ацилировать тРНК. Этот пик расположен между легкой формой фенилаланил-тРНК-синтазы с кажущимся M 90 000 [5] и БСА. Из полученных данных методом Мартина — Эймса [6] было вычислено приближенное значение константы седиментации (4,8 S), что соответствует $M \sim 85$ 000. Следует отметить, что фермент, выделенный стандартной процедурой в присутствии ДФФ, при центрифугировании в градиенте сахарозы характеризовался константой седиментации 5,5 S, что близко к значению 5,25 S, полученному при аналитическом ультрацентрифугировании [3] для нативной ТРСазы (M 120 000).

На основании этих опытов мы пришли к выводу, что ТРСаза в ходе выделения действительно подвергается эндогенному протеолизу, сопровождающемуся отщеплением части полипептидного материала, но сохраняет при этом ферментативную активность.

Обрабатывая нативный препарат ТРСазы, содержащий только полипептиды с M 60 000, экстрактом из клеток поджелудочной железы, мы наблюдали при последующем электрофорезе в денатурирующих условиях появление полосы с M 51 000, а также незначительной полосы с M 40 000 (рис. 3). Электрофорез использованных количеств панкреатического экстракта в тех же условиях не выявил белковых полос в зоне с M свыше 30 000. Такой препарат, где содержание модифицированной формы заведомо превышает 50%, тем не менее не отличается по ферментативной активности от исходной нативной ТРСазы. На рис. 4, видно, что при внесении в пробу одинакового количества ферментного препарата (в молях) активность исходной и модифицированной форм практически не различается в реакции АТР-[32 P]-пирофосфатного обмена, в гидроксаматной реакции и в реакции ацилирования тРНК, т. е. при всех известных методах определения активности синтетаз.

Подвергая гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-100 препарат ТРСазы, содержащий после обработки панкреатическим экстрактом $\sim 70\%$ белка в форме с M 51 000, мы оценили молекулярный вес белка, обладающего ферментативной активностью, как 100 000—105 000 (рис. 5). В этих опытах мы использовали нативный препарат ТРСазы с M 120 000 как один из свидетелей. Сравнение молекулярных весов нативного и модифицированного панкреатическим экстрактом препаратов, а также моле-

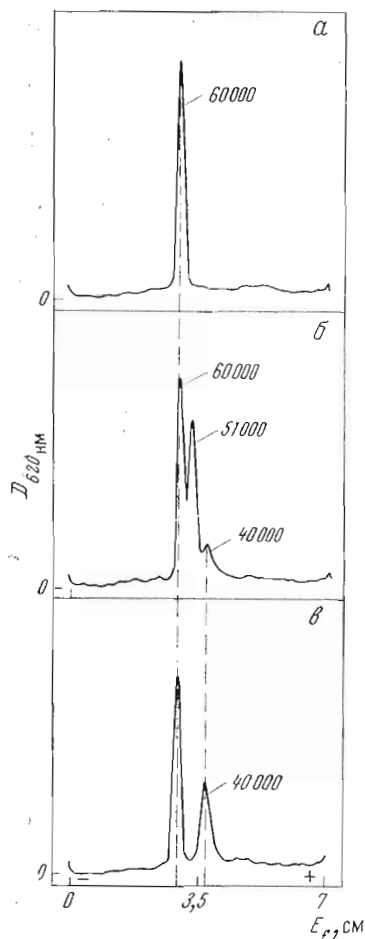


Рис. 1. Денситограммы гелей ПААГ после электрофореза в присутствии ДСН различных препаратов ТРСазы. Препараты получены методом, описанным в работе [3]. Время фореаза 3,5 ч

кулярный вес препарата, претерпевшего эндогенный протеолиз в ходе выделения (рис. 2), привело нас к заключению, что субъединицы, лишенные в результате протеолиза части полипептидного материала, сохраняют способность к димеризации. Действительно, если исходный нативный фермент является димером двух субъединиц с M 60 000, то форма с M 100 000—105 000 может быть димером двух идентифицированных нами полипептидных цепей с M 51 000, а форма с M 85 000 — двух цепей с M 40 000.

Анализ полученного при гель-хроматографии на G-100 материала методом электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 6) выявляет две полосы: основную, соответствующую по молекулярному весу 51 000, и меньшую, совпадающую по подвижности с полипептидной цепью нативной субъединицы. Кроме указанных полос, препарат в незначительном количестве содержит полипептиды с $M \sim 40$ 000.

Одновременное присутствие небольшого количества материала с M 60 000 и 40 000 может указывать на существование, помимо симмет-

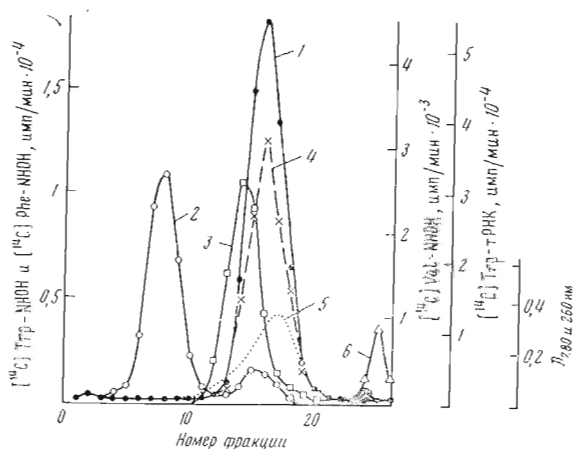


Рис. 2

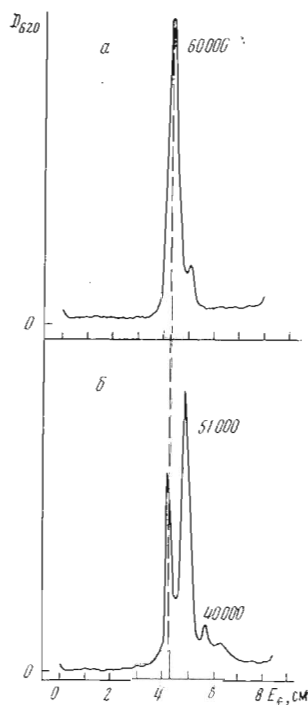


Рис. 3

Рис. 2. Седиментация в линейном градиенте сахарозы ТРСазы, выделенной из поджелудочной железы без обработки ДФФ.

Условия центрифугирования см. раздел «Экспериментальная часть». Активность ТРСазы определяли гидроксамовым методом (1) и по включению $[^{14}\text{C}]$ триптофана в тРНК (4). Активность фенилаланил- (2) и валил- (3) тРНК-синтетаз определяли по гидроксамовому тесту. Концентрацию БСА — по поглощению при 280 нм (5), активность РНКазы — по поглощению кислоторастворимой фракции при 260 нм

Рис. 3. Денситограмма гелей после электрофореза в присутствии ДСН исходного препарата ТРСазы (а) и того же препарата после инкубации с экстрактом поджелудочной железы (б). Время гидролиза 7,5 ч

ричных димерных молекул ТРСазы, гибридных форм, состоящих из субъединиц с M 60 000 и 40 000, 60 000 и 50 000, а также 50 000 и 40 000.

Таким образом, при гидролизе ТРСазы эндогенными протеазами поджелудочной железы возникают близкие по размерам полипептидные цепи с M 51 000 и 40 000. При всех вариантах эндогенного протеолиза полученные полипептиды остаются ассоциированными друг с другом, и димерные модифицированные молекулы ТРСазы сохраняют активность. Из изложенных данных следует, что ранее обнаруженная гетерогенность функционально активных форм ТРСазы [7, 8] может быть связана с неконтролируемым действием эндогенных протеаз.

Интересно, что при разных типах протеолиза под действием трипсина [4], химотрипсина, субтилизина, папаина [9], эластазы [10] и эндогенных протеаз (эта работа и [10]) образуются очень близкие модифицированные формы ТРСазы с M 80 000—85 000, состоящие из двух полипептидных цепей с $M \sim 40$ 000. Характерная для эндогенного протеолиза цепь с M 51 000 наблюдается также в случае трипсинолиза ТРСазы при пониженной температуре [4].

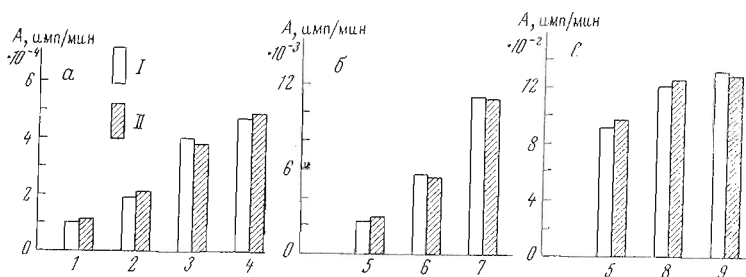


Рис. 4

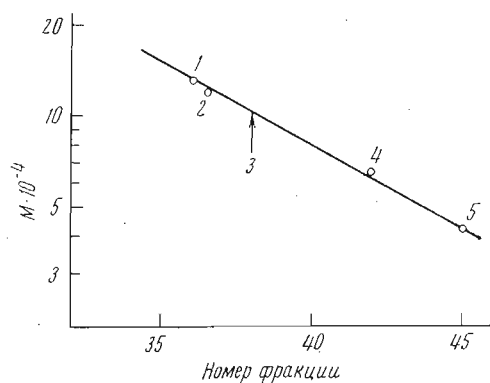


Рис. 5

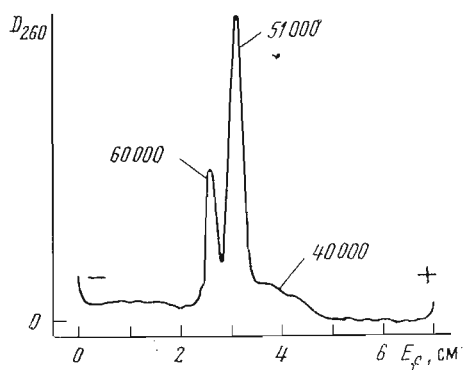


Рис. 6

Рис. 4. Определение активности нативной (I) и модифицированной (II) ТРСазы методом АТР-[32 P]-пирофосфатного изотопного обмена (а), по гидроксаматному тесту (б) и по ацилированию тРНК (в). Количество ТРСазы, внесенное в пробу (в пикомолях субъединиц): 1 — 11; 2 — 28; 3 — 56; 4 — 83; 5 — 1,7; 6 — 4,2; 7 — 8,3; 8 — 3,4; 9 — 5

Рис. 5. Определение молекулярного веса модифицированной ТРСазы методом гелехроматографии на колонке с сефадексом G-100. И использованные белки-маркеры: 1 — БСА (димер); 2 — нативная ТРСаза (M 120 000); 3 — модифицированная ТРСаза; 4 — БСА (мономер); 5 — яичный альбумин (мономер)

Рис. 6. Денситограмма геля после электрофореза в присутствии ДСН модифицированной ТРСазы, подвергнутой гелехроматографии на колонке с сефадексом G-100 (фракция с $M \sim 100$ 000). Время фореа — 3,5 ч. Приведены молекулярные веса соответствующих белковых полос

Эта четко выраженная дискретность протеолитической деградации ТРСазы при использовании различных протеаз широкой специфичности определяется, по-видимому, пространственной структурой фермента. Помимо компактной области с M 40 000, сохраняющей способность к димеризации в функционально активную молекулу, у каждой из субъединиц имеется полипептидный фрагмент ($M \sim 20$ 000), утрата которого не приводит к функциональной инактивации. Проведенный нами анализ трипсинолиза при 25° [4] показал, что в этих условиях происходит последовательное отщепление двух фрагментов с $M \sim 10$ 000 и наблюдается промежуточная форма с M 51 000. Наличие такой же формы при эндогенном протеолизе приводит нас к предположению, что и в этом случае фрагмент с M 20 000 последовательно отщепляется в виде двух полипептидов

с $M \sim 10\,000$. Однако, как показывает электрофоретический анализ (рис. 6), модифицированная при эндогенном протеолизе ТРСаза не содержит пептиды с $M \sim 10\,000$, и, следовательно, отщепленный материал не остается ассоциированным с субъединицами.

Следует обратить внимание на одно существенное обстоятельство: модифицированные молекулы ТРСазы с одним и тем же $M \sim 80\,000$ в зависимости от природы использованного протеолитического фермента или сохраняют ферментативную активность (гидролиз эндогенными протеазами и эластазой (эта работа и [10]), или утрачивают ее [4, 10]. По-видимому, это может означать, что, хотя расщепление прежде всего лимитируется стерическими факторами, экспонированный участок является критическим для активности ТРСазы.

Когда это исследование было закончено, нам была предоставлена возможность ознакомиться с работой [10], где получены сходные с нашими данные и высказаны некоторые близкие к высказанным положениям. Основное различие состоит в небольшой разнице значений молекулярного веса исходной субъединицы (55 000 в работе [10] и 60 000 в этой работе) и в том, что в работе [10] не выявлен продукт эндогенного протеолиза с $M\ 51\,000$.

Экспериментальная часть

Материалы. Использовали [^{14}C] DL-триптофан уд. акт. 1,2 Ки/моль (контора «Изотоп», СССР), [^{14}C]-L-триптофан уд. акт. 46 Ки/моль («Amersham», Англия), L-триптофан, динатриевая соль АТФ, [^{32}P]-пирофосфат (контора «Изотоп»), дитиотреитол (A-grade) и ДФФ («Calbiochem», Швейцария), БСА («Koch-Light», Англия), ДСН («Schuhardt», ФРГ), меркантоэтанол и трис («Merck», ФРГ), сефадекс G-100 (для гель-фильтрации) («Pharmacia», Швеция), реактивы для электрофореза фирмы «Serva» (ФРГ). Акриламид и NN'-метиленабисакриламид были перекристаллизованы соответственно из хлороформа и ацетона, бумага CM 82 («Whatman», Англия) активированный уголь (Norit A.) фирмы «Serva» (ФРГ).

ТРСаза выделена из поджелудочной железы быка, как описано в работе [3]. Использовали форму с $M\ 120\,000 \pm 5\,000$. Концентрацию белка определяли по поглощению растворов при 280 нм. Коэффициент экстинкции ($E_{\text{мг/мл}}^{1\text{ см}}$) для нативной ТРСазы принимали равным 0,90. Фермент хранили замороженным при -70° в 0,02 М трис-НСI буфере, рН 7,5 (концентрация 10—15 мг/мл).

Экстракт из клеток поджелудочной железы быка. Поджелудочную железу, доставленную во льду с мясокомбината не позднее чем через 1,5 ч после забоя животных, измельчали на электромясорубке. Измельченную ткань подвергали автолизу при комнатной температуре 9 ч, после чего к фаршу добавляли воду (1 : 1, по весу) и размельчали в гомогенизаторе РТ1. К гомогенату при постоянном перемешивании добавляли H_2SO_4 до концентрации 0,25 н., после чего гомогенат оставляли на ночь. Гомогенат нейтрализовали NaOH до рН 7,0 и подвергали центрифугированию при 10 000 g. Осадок отбрасывали, а к надосадочной жидкости добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (472 мг на 1 мл раствора при 25°) [11]. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 0,02 М трис-НСI буфере (рН 7,5). Концентрацию белка определяли по Лоури [12].

Протеолиз ТРСазы in vitro. ТРСазу в концентрации 1,5—2 мг/мл инкубировали с экстрактом (0,75—1 мг/мл) в 0,15 М NH_4Cl , 0,02 М трис-НСI буфере (рН 7,5) при 37° от 6 до 10 ч (в зависимости от протеазной активности экстракта). После окончания протеолиза инкубационную смесь центрифугировали 20 мин при 7500 g, надосадочную жидкость собирали и создавали в ней 30%-ную концентрацию этиленгликоля и 0,05 М трис-НСI буфера (рН 7,5). Препарат хранили при -20° .

Гель-хроматографию препарата нативной и модифицированной экстрактом ТРСазы проводили на колонке (1 × 44 см) с сефадексом G-100, как описано ранее [4].

Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН проводили, как описано в работе [4], время фореа указано в подписях к рисункам. Сканирование проводили на денситометре «Chromoscan» («Joусе Loebl», Англия).

Определение активности. Активность нативной и модифицированной ТРСазы определяли гидроксаматным методом, как в работе [4], методом АТР-[³²P]-пирофосфатного изотопного обмена, как в работе [13], и по ацилированию тРНК по методике, разработанной в нашей лаборатории В. З. Ахвердяном. Концентрация веществ в инкубационной пробе для реакции ацилирования тРНК в объеме 0,2 мл была: 125 мМ трис-НСl буфер (рН 7,5); 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂; 3,75 мМ АТР; 0,01 мМ L-[¹⁴C] триптофан (46 Ки/ммоль); 0,06%-ного желатина, обработанного бентонитом, 10Е (D₂₆₀) тРНК пекарских дрожжей, содержащей 3%-ную триптофановую тРНК, 0,1—0,3 мкг ТРСазы. Инкубацию проводили в течение 30 с при 20°. Реакцию останавливали, добавляя к инкубационной пробе 1 мл 1%-ного цетавлона и 0,1 мл водного раствора высокомолекулярной РНК из печени крысы (40 ОЕ/мл, D₂₆₀) в качестве носителя. Осадки собирали на нитроцеллюлозных фильтрах, фильтры промывали 50 мл Н₂O, после чего радиоактивность просчитывали в толуольном сцинтилляторе на счетчике «Intertechnique» SL-30 (Франция).

Центрифугирование ТРСазы в линейном градиенте сахарозы. Сахарозный градиент готовили из исходных растворов 5 и 20%-ной сахарозы (по 2,45 мл), содержащих 0,05 М трис-НСl буфер (рН 9,0) и 5·10⁻³ М 2-меркаптоэтанол. Сверху наслаивали 0,1 мл раствора, содержащего 0,8 мг фермента в том же буфере без сахарозы. Центрифугирование проводили на роторе SV-39 в центрифуге «Spinco» L-2 (США) в течение 20 ч при 39 000 об/мин (24°). Собирали фракции по 3 капли. Включение [¹⁴C] аминокислот в соответствующие тРНК проводили, как описано в работе [14]. Кажущиеся молекулярные веса составляли: для фенилаланил-тРНК-синтазы — 180 000 и 90 000, для валил-тРНК-синтазы — 110 000, для БСА — 67 000 и для РНКазы — 13 500.

Определение молекулярного веса. Молекулярный вес форм ТРСазы определяли методами гель-хроматографии и электрофореза в ПААГ в присутствии ДНС, как описано в работе [4], с использованием тех же белковых маркеров.

Авторы благодарят А. В. Парина, предоставившего свои данные по центрифугированию модифицированного фермента в сахарозном градиенте, В. З. Ахвердяна за препарат тРНК и Ю. Лабуэсс (Университет, Бордо, Франция), познакомившую нас с работой [10] до публикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Favorova O., Stelmastchuk V., Parin A., Kchilko S., Kiselev N., Kisselev L. (1971) Abstr. Commun. 7th Meet. Eur. Biochem. Soc., 149.
2. Gros C., Lemaire G., van Rapenbusch R., Labouesse B. (1972) J. Biol. Chem., 247, 2931—2943.
3. Фаворова О. О., Кочкина Л. Л., Шайго М., Парин А. В., Хилько С. Н., Прасолов В. С., Киселев Л. Л. (1974) Молекулярн. биология, 8, 729—741.
4. Прасолов В. С., Фаворова О. О., Киселев Л. Л. (1975) Биоорган. химия, 1, 61—69.
5. Kosakowski M. H. I. E., Böck A. (1970) Eur. J. Biochem., 13, 67—73.
6. Martin R. G., Ames B. N. (1961) J. Biol. Chem., 236, 1373—1377.
7. Парин А. В., Киселев Л. Л. (1969) Молекулярн. биология, 3, 901—908.
8. Lemaire G., Dorizzi M., Spotorno G., Labouesse B. (1969) Bull. Soc. Chim. Biol., 5, 495—510.
9. Epely S., Lemaire G., Gros C. (1973) Ninth International Congress of Biochemistry, Stockholm, Abstract Book, p. 199, 3 q 15.
10. Lemaire G., Gros C., Epely S., Kaminski M., Labouesse B. (1975) Eur. J. Biochem., 51, 237—252.
11. Мосолов В. В. (1971) Протоолитические ферменты, стр. 14, «Наука», М.

12. Lowry O., Rosenbrough N., Farr N., Randall R. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—272.
13. Nevinsky G. A., Favorova O. O., Lavrik O. I., Petrova T. D., Kochkina D. L., Savchenko T. I. (1974) *FEBS Lett.*, **43**, 135—138.
14. Muench K. H., Berg P. (1966) In *Procedures in Nucleic Acid Research* (Cantoni C. L. and Davis D. K., eds), pp. 375—383, Harper and Row, N. Y.

Поступила в редакцию
15.XI.1974.

**FUNCTIONALLY ACTIVE MODIFIED FORMS OF TRYPTOPHANYL-tRNA-
SYNTHETASE OBTAINED BY LIMITED ENDOGENOUS PROTEOLYSIS**

PRASOLOV V. S., FAVOROVA O. O., KISSELEV I. L.

*Institute of Molecular Biology Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

On endogenous proteolysis of native beef pancreas tryptophanyl-tRNA synthetase which consists of two equal subunits (mol. wt 60 000 daltons), two polypeptides having mol. wt of 51 000 and 40 000 are produced. These modified forms exist as associates and retain the enzymatic activity as evidenced by the hydroxamate test, ATP-[³²P]-isotope-exchange and acylation of tRNA.
