

Henryk BERBEĆ, Tomasz BORKOWSKI

**Obecność dwóch form syntetaz glutamyl-tRNA i asparagilo-tRNA  
w mózgu i wątrobie \***

Наличие двух форм синтетаз глутамило-тРНК и аспарагило-тРНК  
в мозгу и печени

Two Forms of Glutamyl-tRNA and Aspartyl-tRNA Synthetases from Liver  
and Brain\*

Pojawiły się ostatnio w piśmiennictwie doniesienia o występowaniu syntetaz aminoacylo-tRNA w formach różniących się masą cząsteczkową oraz niektórymi właściwościami (4, 5, 9, 10, 12, 14). Istnieje możliwość, że regulacja translacji w procesie biosyntezy białka może odbywać się między innymi na etapie powstawania aminoacylo-tRNA przy udziale różnych form syntetaz aminoacylo-tRNA (5).

W naszych dotychczasowych badaniach nad syntetazą glutaminianową (Glu-tRNA) pochodzenia zwierzęcego znajdowaliśmy aktywność enzymatyczną we frakcjach zawierających białka o różniącej się znacznie masie cząsteczkowej (3). W niniejszej pracy podjęto próbę porównania aktywności aminoacylo-tRNA syntetazowej dla kwasów glutaminowego i asparaginowego we frakcjach otrzymanych z cytozolu wątroby i mózgu metodą sita molekularnego (Sephadex G-200).

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzano na wątrobie i mózgu królików i cieląt. Narządy preparowano natychmiast po zabiciu zwierzęcia i poddawano dalszej obróbce zaraz lub po kilkugodzinnym przetrzymywaniu w lodzie. Narządy homogenizowano w homogenizatorze szklanym typu Potter w płynie o składzie: 0,05 M bufor Tris-Cl pH 7,4, 0,25 M sacharoza, 6 mM 2-merkaptoetanol — w stosunku 1 g tkanki na 2 ml płynu. Wszystkie czynności przeprowadzano w temp. ok. 4°C. Homogenat wirowano 20 min.

\* Praca wykonywana w ramach problemu węzłowego 09.7.1. koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

\* This work was supported by the Polish Academy of Sciences within the Project 09.7.1.

przy  $20\,000\times g$ , osad wyrzucano, supernatant wirowano ponownie przy  $105\,000\times g$  w czasie 90 min. w celu otrzymania supernatantu postmikrosomalnego.

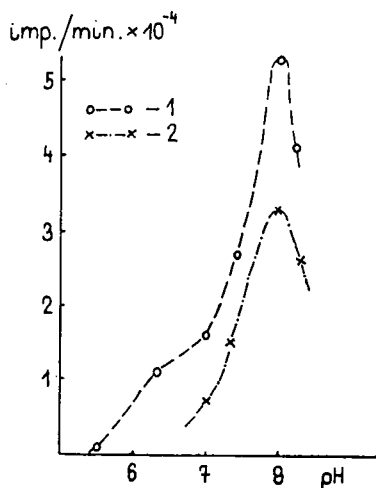
Aktywność aminoacylo-tRNA syntetazową oznaczano na zasadzie pomiaru zależnej od aminokwasu wymiany  $PP_i$ -ATP metodą Lemoiné'a i wsp. (7). Mieszanina reakcyjna zawierała w 1 ml: 100  $\mu$ moli buforu Tris-Cl pH 8,0, 5  $\mu$ moli  $MgCl_2$ , 10  $\mu$ moli NaF, 10  $\mu$ moli 2-merkaptioetanolu, 2  $\mu$ mole ATP, 2  $\mu$ mole aminokwasu, 2  $\mu$ mole  $[^{32}P]$   $Na_4P_2O_7$  (ok. 1  $\mu$ Ci) oraz 25–100  $\mu$ g preparatu enzymatycznego. Inkubację prowadzono 20 min. w temp.  $37^\circ C$ . Radioaktywność próbek mierzono w liczniku scyntylicyjnym z wydajnością ok. 95%. Jednostkę aktywności enzymatycznej definiowano jako taką ilość enzymu, która powoduje inkorporację 1 nanomola  $[^{32}P]$   $PP_i$  do ATP w czasie 1 min. w warunkach pomiaru. Ślepa próba nie zawierała aminokwasu. Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (8).

Odczynniki:  $[^{32}P]$   $Na_4P_2O_7$  firmy The Radiochemical Center — Amersham; Sephadex G-200 firmy Pharmacia; Tris, ATP, 2-merkaptioetanól, kwas glutaminowy i asparaginowy firmy Calbiochem; pozostałe odczynniki — POCH, Gliwice.

Supernatant postrybosomalny z wątroby i mózgu frakcjonowano na żelu Sephadex G-200 (kolumna o wymiarach  $1,8\times 85$  cm). Do równoważenia i elucji służył bufor o składzie: 0,05 M Tris-Cl pH 7,4, 1 mM  $MgCl_2$ , 6 mM 2-merkaptioetanolu, 10% glicerolu. Jednorazowo podawano na kolumnę 2 ml (20–40 mg białka) preparatu. Zbierano 3 ml porcje eluatu, w których oznaczano stężenie białka oraz aktywność syntetaz glutamyl- oraz asparagilo-tRNA.

#### WYNIKI BADAŃ

Na wstępie ustalono optymalne warunki pomiaru aktywności aminoacylo-tRNA syntetazowej. Optimum pH dla reakcji wymiany  $PP_i$  — ATP wynosi ok. 8 dla obydwu badanych enzymów (ryc. 1). W czasie 0–30 min. istnieje liniowa zależność narastania piętna izotopowego ATP od czasu



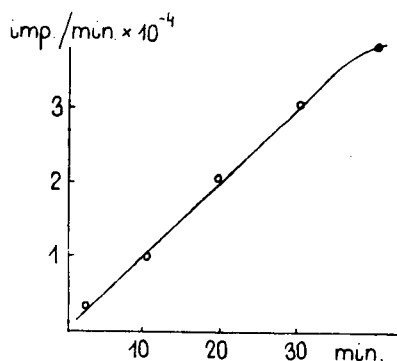
Ryc. 1. Inkorporacja  $[^{32}P]$   $PP_i$  do ATP w obecności syntetazy aminoacylo-tRNA z wątroby królika w zależności od pH mieszaniny reakcyjnej; bufor: Tris-maleinian potasu: pH 5,5–7,0; Tris-Cl: pH 7,4–8,3. 1 — w obecności kwasu glutaminowego, 2 — w obecności kwasu asparaginowego; enzym frakcjonowano na żelu Sephadex G-200 (próbówka nr 55 — ryc. 3)

Effect of pH on the incorporation of  $[^{32}P]$   $PP_i$  into ATP in the presence of aminoacyl-tRNA synthetase from rabbit liver; buffers: Tris-potassium maleate: pH 5.5–7.0; Tris-Cl: pH 7.4–8.3; 1 — for glutamic acid, 2 — for aspartic acid; the preparation was fractionated on Sephadex G-200 column (sample No. 55 — Fig. 3)

w warunkach pomiaru (ryc. 2). Stwierdzono, że pozbawienie mieszaniny reakcyjnej ATP lub preparatu enzymatycznego daje niemal ten sam wynik rzędu 2000 imp./min. Jeżeli brak w mieszaninie reakcyjnej aminokwasu, to otrzymuje się wynik prawie dwa razy wyższy (tab. 1).

Ryc. 2. Kinetyka inkorporacji [ $^{32}$ P] PP $_i$  do ATP w obecności syntetazy glutamyl-tRNA z wątroby królika; enzym frakcjonowano na żelu Sephadex G-200 (próbówka nr 55 — ryc. 3)

Kinetics of the incorporation of [ $^{32}$ P] PP $_i$  into ATP in the presence of aminoacyl-tRNA synthetase from rabbit liver; the preparation was fractionated on Sephadex G-200 column (sample No. 55 — Fig. 3)



Badania wykazały, że frakcjonowanie supernatantu postmikrosomalnego z wątroby i mózgu na żelu Sephadex G-200 pozwala otrzymać aktywność syntetaz glutamyl- i asparagilo-tRNA rozmieszczoną w dwóch oddalonych od siebie szczytach, z których pierwszy wypływa w objętości zerowej kolumny, następny w miejscu odpowiadającym masie cząsteczkowej hemoglobiny. W obydwu szczytach aktywności właściwe syntetazy glutamyl-tRNA przewyższyły przeszło dwukrotnie odpowiednie aktywności syntetazy asparagilo-tRNA, tak w preparatach z wątroby, jak i z mózgu. W preparatach mózgowych aktywność syntetazy glutamyl-tRNA obydwu szczytów była tego samego rzędu, podczas gdy aktywność syntetazy asparagilo-tRNA pierwszego szczytu przewyższała wyraźnie odpowiednią aktywność w drugim szczycie. W preparatach wątrobowych znajdowano w drugim szczycie (w porównaniu z pierwszym) niższe aktywności syntetazy glutamyl-tRNA, zaś kilkakrotnie wyższe syntetazy asparagilo-tRNA (ryc. 3).

#### DYSKUSJA

Pomiar wymiany PP $_i$ —ATP katalizowany przez syntetazę aminoacylo-tRNA przeprowadzany jest przeważnie w buforze Tris-Cl pH 7,4—7,6 (7, 9, 10, 14, 15). Optimum pH dla tej reakcji zależy może od rodzaju enzymu i od aminokwasu. W badaniach własnych (ryc. 1) wykazano, że w reakcjach katalizowanych przez syntetazy glutaminianową i asparagininową wątroby i mózgu optimum pH wynosi ok. 8,0.

Tab. 1. Wpływ składu mieszaniny reakcyjnej na aktywność syntetaz glutamyl-tRNA i asparagilo-tRNA

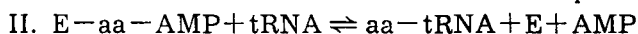
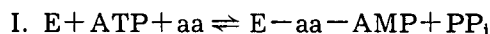
Effect of the reaction mixture composition on the activity of glutamyl-tRNA and aspartyl-tRNA synthetases from rabbit liver

Skład mieszaniny reakcyjnej	[ <sup>32</sup> P] ATP imp./min.	
Pełny	31 060 (Glu)	20 380 (Asp)
—Preparat enzymatyczny *	1950	
—Aminokwas	4020	
—ATP	2052	

\* Preparat enzymatyczny z wątroby królika frakcjonowany na żelu Sephadex G-200 (próbówka 55 — ryc. 3).

\* The preparation was fractionated on Sephadex G-200 column (sample No. 55 — Fig. 3).

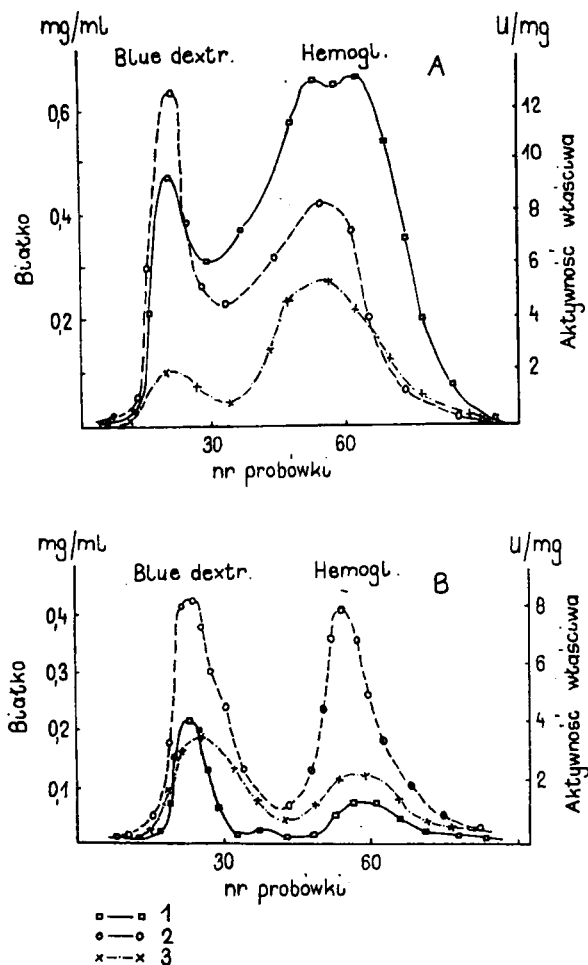
Reakcja katalizowana przez syntetazy aminoacylo-tRNA przebiega w kilku etapach. Dla większości tych enzymów udało się udowodnić istnienie dwóch etapów: \*



Pomiar aktywności enzymów w badaniach własnych prowadzono w oparciu o etap I reakcji. Wyniki zamieszczone w tab. 1 wskazują, że pominięcie w składzie mieszaniny reakcyjnej aminokwasu lub ATP daje niejednakowy poziom radioaktywności próbki, prawie dwukrotnie wyższy w przypadku pominięcia aminokwasu. Prawdopodobnie spowodowane jest to obecnością niewielkich ilości aminokwasów endogennych w badanych preparatach białkowych. Dodanie tRNA do mieszaniny reakcyjnej o pełnym składzie (dane nie zamieszczone) powodowało wyraźne obniżenie inkorporacji PP<sub>i</sub> do ATP. Należy wnosić, że reakcja katalizowana przez badane syntetazy aa-tRNA przebiega co najmniej w dwu etapach.

Jak wynika z ryc. 3, rozfrakcjonowanie postmikrosomalnego cytozolu wątroby i mózgu na żelu Sephadex G-200 daje dwa szczyty aktywności aa-tRNA syntetazowej dla obydwu badanych enzymów. W pierwszym szczycie, który pojawia się w objętości zerowej kolumny, co odpowiada masie cząsteczkowej powyżej 500 000, mogły się znajdować wysokocząsteczkowe kompleksy syntetaz, funkcjonujące w procesie biosyntezy białka. W skład tych kompleksów wchodzi prawdopodobnie komponenty kwasów nukleinowych, o czym świadczy wysoki stosunek absorpcji A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> (3). Liczni autorzy (1, 2, 6, 11, 15) znajdowali podobne kompleksy

\* Stosowane skróty: E — enzym; aa — aminokwas; aa-tRNA — aminoacylo-tRNA; PP<sub>i</sub> — nieorganiczny pirofosforan.



Ryc. 3. Rozmieszczenie aktywności właściwej syntetaz aminoacylo-tRNA w różnych frakcjach postmikrosomalnego supernatantu (A) wątroby królika, (B) mózgu cielęcia; frakcje uzyskiwano w wyniku sączenia przez żel Sephadex G-200; 1 — stężenie białka, 2 — aktywność oznaczana w obecności kwasu glutaminowego, 3 — aktywność oznaczana w obecności kwasu asparaginowego

Specific activity of aminoacyl-tRNA synthetases in various fractions of the post-microsomal supernatant of (A) rabbit liver, (B) calf brain; the fractions were obtained by gel filtration on Sephadex G-200; 1 — protein concentration, 2 — glutamyl-tRNA synthetase activity, 3 — aspartyl-tRNA synthetase activity

w preparatach zwierzęcych. V a n n e g o o r i B l o e m e n d a l (15) izolowali z wątroby szczura kompleks, który występował w postmikrosomalnym supernatancie w postaci określonych morfologicznie cząsteczek (particles) zawierających syntetazy aminoacylo-tRNA: glutaminianową, leucynową, izoleucynową, lizynową i metioninową. Ponadto znajdowali powyższe enzymy w cytozolu w formie wolnej.

Hele i Herbert (6) izolowali z gruczołu mlecznego szczura wysokocząsteczkowy kompleks, zawierający 8 syntetaz o masie cząsteczkowej  $3 \times 10^6$ , zlokalizowany w cząstkach (particles) otrzymany z supernatantu postmikrosomalnego. Kompleks zawierał cholesterol oraz RNA (ok. 4%). Roberts i Olsen (11) w wyniku wirowania w gradiencie sacharozy supernatantu z komórek raka wysiękowego Ehrlicha otrzymywali 2, a dla niektórych enzymów nawet 3 szczyty aktywności aa-tRNA syntetazowej dla 9 badanych aminokwasów. Autorzy utrzymują, że natywną postacią syntetaz jest ich forma skompleksowana; forma wolna pojawia się dopiero w czasie preparacji. Stosowana w badaniach własnych homogenizacja materiału przy użyciu homogenizatora szklanego o gładkich ściankach i teflonowego pistla, następnie wirowanie i bezpośrednie sączenie supernatantu postmikrosomalnego przez żel dekstranowy — to bardzo łagodne warunki preparacyjne i wydaje się mało prawdopodobne, aby forma lżejsza była produktem rozbicia pierwotnego kompleksu. Wydaje się, że obydwie postaci badanych syntetaz występują *in vivo*.

Surguchov i Surguchova (14) otrzymali z *Bacillus brevis* 2 formy syntetazy glicylo-tRNA o masie cząsteczkowej 226 000 i 66 000, z których obydwie katalizowały pierwszy etap reakcji, a jedynie forma o wyższej masie cząsteczkowej była zdolna do aminoacylacji tRNA. Nasze obecne i poprzednie (3) badania wskazują, że obydwie formy syntetazy glutaminianowej i prawdopodobnie asparaginianowej zdolne są do katalizowania obydwu etapów reakcji.

### Wnioski

1. W postmikrosomalnym supernatancie homogenatu wątroby królika i mózgu cielęcia rozdzielanym na żelu Sephadex G-200 wykazano obecność aktywności syntetaz glutamilo-tRNA i asparagilo-tRNA w dwóch frakcjach. Masa cząsteczkowa jednej frakcji odpowiadała masie cząsteczkowej hemoglobiny, druga frakcja wykazywała masę cząsteczkową przewyższającą 500 000 daltonów.

2. W obydwu frakcjach aktywność właściwa syntetazy glutamilo-tRNA przewyższała przeszło dwukrotnie odpowiednie aktywności syntetazy asparagilo-tRNA i to zarówno w preparatach mózgowych, jak i wątrobowych. W preparatach otrzymanych z mózgu aktywność syntetazy glutamilo-tRNA obydwu frakcji była tego samego rzędu, podczas gdy aktywność syntetazy asparagilo-tRNA w pierwszej frakcji przewyższała aktywność w drugiej frakcji.

3. Pomiary aktywności syntetaz glutamyl-tRNA i asparagilo-tRNA prowadzone w oparciu o reakcję wymiany  $PP_1$ —ATP w pełni potwierdzają sugestie wysunięte wcześniej na podstawie badania wiązania [ $^{14}C$ ] glutaminianu do tRNA w odniesieniu do występowania dwóch form enzymu w cytozolu preparatów zwierzęcych. Optimum  $pH$  reakcji wymiany  $PP_1$ —ATP wynosi 8,0 dla obydwu badanych enzymów. Przedyskutowano możliwość występowania badanych syntetaz w mózgu i w wątrobie w formie wolnej oraz w formie kompleksów wieloenzymatycznych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bandyopadhyay A. K., Deutscher M. P.: *J. Mol. Biol.* **60**, 113—122, 1971.
2. Berg B. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **395**, 173—178, 1975.
3. Berbeć H., Borkowski T.: Charakterystyka glutamyl-tRNA syntetazy wątrobowej. — Załącznik do Raportu nr 1 (1976 r.) Temat: 09.7.1.2.3., PAN.
4. Dittgen, R. M., Leberman R.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**, 543—551, 1976.
5. Francis T. A., Nagel G. M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **70**, 862—868, 1976.
6. Hele P., Herbert L.: *Biochim. Biophys. Acta* **479**, 311—321, 1977.
7. Lemoine F., Waller J. P., van Rapenbush R.: *Eur. J. Biochem.* **4**, 213—221, 1968.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
9. Rouget P., Chapeville G.: *Eur. J. Biochem.* **23**, 452—458, 1971.
10. Rouget P., Chapeville G.: *Eur. J. Biochem.* **23**, 459—467, 1971.
11. Roberts W. K., Olsen M. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **454**, 480—492, 1976.
12. Rymo L., Lundvik L., Lagerkvist U.: *J. Biol. Chem.* **247**, 3888—3899, 1972.
13. Sein K. T., Baćarević A., Kanazir D.: *Analyt. Biochem.* **28**, 65—69, 1969.
14. Surguchov A. P., Surguchova I. G.: *Eur. J. Biochem.* **54**, 175—184, 1975.
15. Vennegoor C., Bloemendal H.: *Eur. J. Biochem.* **26**, 462—473, 1972.

Otrzymano 31 X 1978.

## РЕЗЮМЕ

Обнаружено наличие двух форм синтетаз глютамило-тРНК и аспарагило-тРНК отличающихся между собой массой частиц в постмикросомальном супернатанте печени и мозга фракционированным с помощью колонн с сефадексом G-200. Активности обеих форм синтетаз глютамило-тРНК почти превышали двоекратно соответствующие активности синтетазы аспарагило-тРНК. Была обсуждена возможность выступления исследованных синтетаз в мозгу и печени в свободной форме, а также в виде полиэнзиматических комплексов.

## SUMMARY

Two forms of glutamyl-tRNA and aspartyl-tRNA synthetases differing in molecular weight have been found in the fractions obtained by gel filtration on Sephadex G-200 of postmicrosomal supernatant from liver and brain. Specific activities of the both forms of glutamyl-tRNA synthetase exceeded almost two-fold the appropriate activities of the forms of the aspartyl-tRNA synthetase. The possibility of the existence of these two synthetases in liver and brain as a multienzyme complexes was discussed.