



УДК 576.31:577.217.32

## ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И БИОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ТРИПТОФАНИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

Е. Л. Палей, В. Н. Баранов, Н. Е. Зиновьев, Л. Л. Киселев

**Введение.** Особенностью эукариотических клеток по сравнению с прокариотическими является их сложная внутриклеточная организация, приводящая к разделению ряда биохимических циклов в пространстве, что создает дополнительные возможности регуляции клеточных функций. Однако для ряда ключевых процессов, в том числе такого, как белковый синтез, многое в отношении их пространственной организации *in vivo* остается неясным.

Как известно, аминоацил-ТРНК-синтетазы (КФ 6.1.1), катализирующие синтез аминоацил-ТРНК, выделяют в форме индивидуальных молекул из цитоплазмы или органелл клеток, их обнаруживают также в составе мультиферментных комплексов («кодосом»), полирибосом и рибосом [1]. Вопрос о внутриклеточной локализации этих ферментов остается актуальным, поскольку до сих пор применялись методы исследования не целых, а разрушенных клеток и клеточных фракций, что, естественно, могло приводить к перераспределению материала между компонентами клеток.

При детальном иммунохимическом изучении одной из аминоацил-ТРНК-синтетаз эукариот — бычьей триптофанил-ТРНК-синтетазы (ТРС) (КФ 6.1.1.2) [2, 3] и последующем получении моноклональных антител к этому ферменту [4] стало возможным исследование внутриклеточной локализации этого представителя аминоацил-ТРНК-синтетаз высших организмов с использованием сочетания иммунологического, электронно-микроскопического и биохимического подходов, что сделано в этой работе впервые.

**Материалы и методы.** Клетки. В работе использовали монослойную культуру клеток почки быка (*Madin Darby Bovine Kidney* — *MDBK*), полученную в результате спонтанной трансформации. Клетки культивировали в среде RPMI («Flow Laboratories») с добавлением 10 %-ной телячьей сыворотки, 0,045 %-ного глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл канамицина.

Выделение бычьей триптофанил-ТРНК-синтетазы. Триптофанил-ТРНК-синтетазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота выделяли по ранее описанному методу [5] с небольшими модификациями. Гомогенность препарата проверяли электрофорезом в 12,5 %-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэмли [6] с последующей окраской геля Кумасси или азотнокислым серебром [7]. Активность ТРС определяли в реакции аминоацилирования ТРНК с использованием L-[<sup>14</sup>C]-триптофана (56 мКи/ммоль, «Amersham», Англия) и в реакции АТФ-[<sup>32</sup>P]-пирофосфатного обмена ([<sup>32</sup>P]-пирофосфат ~ 200 мКи/ммоль).

Получение антител. Для получения поликлональных антител гомогенный препарат ТРС вводили кроликам породы Шиншилла четыре раза по 5 мг на животное в полном адьюванте Фрейнда («Difco», США) с интервалами 21 день, 26 дней и 9 месяцев. Кровь отбирали из сонной артерии на восьмой день после последней инъекции

антигена. В радиальной иммунодиффузии [8] антисыворотки (АС) и ТРС наблюдали одну полосу преципитации. Иммуноглобулиновую фракцию из кроличьей АС получали осаждением сульфатом натрия с последующим фракционированием на ДЭАЭ-целлюлозе [3].

Специфические антитела получали связыванием иммуноглобулиновой фракции АС кролика с гомогенной ТРС, иммобилизованной на диазотированной целлюлозе, приготовленной по методу Гурвича [9]. После отмывки сорбента 0,01 М Na-фосфатным буфером, рН 7,0 0,14 М NaCl (PBS) связавшиеся с ТРС антитела элюировали 0,2 М глицин-HCl, рН 2,5 и нейтрализовали.

Мышечные моноклональные антитела к ТРС из поджелудочной железы быка (AM<sub>1</sub>) получены С. Ф. Берестенем, как описано ранее [4]. Чистоту препарата проверяли электрофоретически, иммунологическую активность выявляли в реакции иммунопреципитации.

Контрольный препарат истощенных антител получали инкубацией моноклональных антител (1,14 мг/мл) с ТРС, иммобилизованной на диазоцеллюлозе. После истощения оптическая плотность препарата составляла 0,025 ед. A<sub>550</sub>. Препарат истощенных антител проверяли методом ELISA, сорбируя ТРС на пластике («Flow Laboratories»). Пробы обрабатывали антимышными иммуноглобулинами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Окраску препаратов проводили 0,01 %-ным раствором орто-фенилендиамина в присутствии 0,03 %-ной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 20 мМ Na-цитратного буфера, рН 4,7. В случае контроля (истощенных антител) окраска, отражающая пероксидазную активность, визуально не отличалась от фоновой.

**Экстракты.** Клеточные экстракты получали лизированием отмытых клеток (MDBK) в буферном растворе (10 мМ трис-HCl, рН 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ дитиотреитол (ДТТ), 20 % по объему глицерина, 1 %-ный Nonidet P40 (NP40), 3 мМ динизопропилфторфосфат (ДФФ)). После инкубации 1 ч при 0 °С суспензию центрифугировали при 12000 об/мин 15 мин.

Экстракты из поджелудочной железы крупного рогатого скота получали гомогенизацией ткани в электрической мясорубке при 4 °С в буферном растворе (10 мМ трис-HCl, рН 7,5, 0,15 М KCl, 1·10<sup>-4</sup> М триптофан, 5·10<sup>-4</sup> М ДТТ, 1·10<sup>-4</sup> М ЭДТА, 0,3 мМ ДФФ). Гомогенат центрифугировали 30 мин при 4000 об/мин и 4 °С. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость центрифугировали 1 ч при 15000 об/мин. Супернатант использовали для иммунопреципитации и иммуноблоттинга, а осадок — для получения митохондрий [10]. Для устранения цитоплазматических примесей митохондрии обрабатывали раствором дигитонина — 1,5 мг/мл («Mergck», ФРГ). После отмывки от детергента митохондрии замораживали в жидком азоте, растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния и суспендировали в гомогенизаторе стекло/стекло притертым песком в буферном растворе для лизиса. Лизаты центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин, осадки отбрасывали. Для определения активности в АТФ-<sup>32</sup>P-пирофосфатном обмене использовали препарат, предварительно диализованный для удаления эндогенных аминокислот 24 ч против буферного раствора (50 мМ трис-HCl, рН 7,5, 2 мМ меркаптоэтанол, 0,3 мМ ДФФ). Контрольная проба не содержала в реакционной смеси триптофан, активность в ней была близка к фоновой.

Ткани человека гомогенизировали в буферном растворе (50 мМ трис-HCl, рН 7,5, 50 мМ KCl, 1,5 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 10 %-ный глицерин, 3 мМ ДФФ). В дальнейшем гомогенаты обрабатывали, как описано ранее.

Концентрацию белка в экстрактах определяли по окраске реактивом Кумасси [11], бычий сывороточный альбумин (БСА) использовали как стандарт.

**Иммунопреципитация.** ТРС и белки гомогенатов после взаимодействия с антителами обрабатывали стафилококковой суспензией (*St. aureus*), предварительно отмытой буферным раствором (50 мМ трис-HCl, рН 7,6, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 0,5 %-ный NP40, 5 мг/мл БСА). Иммунопреципитаты, абсорбированные на стафилококковой суспензии, отмывали трижды буфером RIPA [12], суспендировали в буферном растворе для нанесения образцов, кипятили 5 мин и анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях.

**Иммуноблоттинг.** После электрофореза по Лэмбли препараты суммарных белков клеток, тканевых и митохондриальных экстрактов переносили под прессом на два нитроцеллюлозных фильтра (диаметр пор 0,45 мкм, «Schleicher & Schull», ФРГ). Один фильтр окрашивали Кумасси бриллиантовым синим и отмывали 5 %-ной уксусной кислотой, а второй фильтр после отмывки в буферном растворе (0,1 М Na-фосфат, рН 7,5, 0,15 М NaCl, 0,05 %-ный Tween20) инкубировали со специфическими анти-ТРС кроличьими антителами в разведении 1:15 в течение ночи при комнатной температуре. После

отмывки антител фильтры обрабатывали вторыми анти-кроличьими козьими *Fab*-фрагментами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Sigma», США). Конъюгаты любезно предоставлены Н. В. Энгельгардт (ВОНЦ АМН СССР). Инкубацию проводили 2 ч при комнатной температуре. После отмывки фильтра буферным раствором (50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,15 М NaCl) окраску выявляли 0,05 %-ным раствором 4-Cl-1-нафтола в 50 мМ трис-НСl, рН 7,5 с добавлением 0,05 %  $H_2O_2$ .

Электронная микроскопия. Покровные стекла с культурой клеток *MDBK* фиксировали 30 мин при 22 °С в 0,15 М какодилатном буферном растворе, рН 7,3, содержащем 6 % параформальдегид, 0,05 % глутаровый альдегид, 0,1 % сапонины. Препараты промывали тем же буфером с добавлением 3,5 % сахарозы 12 ч при 4 °С, обрабатывали раствором, включающим 0,5 мг/мл боргидрида, в 0,01 М Na-K-фосфатном буфере, рН 7,2—10 мин. Отмывали 30 мин *PBS*, далее обработку вели по непрямому иммунопероксидазному методу [3]. Клетки инкубировали 5 ч в растворе моноклональных или специфических кроличьих поликлональных антител в разведении 1 : 10, после чего обрабатывали раствором антимышиных кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена (Дако), в разведении 1 : 10 или антикроличьими козьими *Fab*-фрагментами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Пероксидазную активность выявляли 0,05 %-ным раствором 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) в 0,05 М трис-НСl, рН 7,5, содержащем 0,03 %  $H_2O_2$ . После отмывки проводили постфиксацию в 1,33 %-ном растворе  $OsO_4$ . После дегидратации клеток возрастающими концентрациями ацетона препараты заливали смесью эпон-аралдит и просматривали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы, полученные на «Ультратоме ЛКБ III», без дополнительного окрашивания просматривали в электронном микроскопе JEM-100 С.

Контроли на специфичность иммунохимической реакции включали инкубацию фиксированных клеток: 1) с истощенными на ТРС-сорбенте моноклональными антителами; 2) с антимышиными кроличьими иммуноглобулинами, конъюгированными с пероксидазой; 3) с ДАБ. Контрольные препараты клеток, не подвергавшихся обработке антителами, окрашивали цитратом свинца.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты, полученные при помощи методов иммунной электронной микроскопии с использованием моноклональных и поликлональных антител, не отличались между собой. Эти данные можно считать надежными ввиду высокой специфичности препарата моноклональных антител ( $AM_1$ ) [4] и выявления иммуноблоттингом с помощью моноспецифических поликлональных антител в лизате клеток линии *MDBK* основной полосы с молекулярной массой 60000 (рис. 1, а, см. вклейку), соответствующей субъединице ТРС [5].

Предварительный просмотр препаратов в световом микроскопе выявил различия в степени окраски цитоплазмы в разных клетках (рис. 2, см. вклейку). Наряду с интенсивно окрашенными округлыми мелкими клетками (10—12 мкм) встречались слабоокрашенные распластаные клетки размером ~20 мкм. Одновременно с крайними формами видны клетки с промежуточной степенью окраски, причем уровень окраски варьировал в значительно более широких пределах, чем размеры клеток. Поскольку в работе использовали несинхронную культуру, разный светооптический уровень содержания фермента, по-видимому, связан с тем, что клетки находятся в разных фазах клеточного цикла. Окраску ядер можно предположить лишь в отдельных, интенсивно окрашенных клетках (рис. 2).

При электроно-микроскопическом анализе расположение ТРС в клетках соответствовало местам отложения темноокрашенного электронноплотного продукта иммуноцитохимической реакции. В соответствии с данными световой микроскопии при малых увеличениях электронного микроскопа обнаружили различную степень окраски клеток продуктом реакции (рис. 3, а, б, см. вклейку). Продукт реакции в виде мелкогранулярных или аморфных преципитатов диффузно окрашивал цитозоль. Клетки с преобладанием мелкогранулярных преципитатов обычно имели менее интенсивную окраску. Преобладание аморфного продукта реакции соответствует более интенсивной окраске цитоплазмы.

При иммунопероксидазном методе происходит отложение конечного продукта реакции в виде гранул с радиусом около 20 нм, что

ограничивает топографическое разрешение при электронной микроскопии [14]. Известно, что рибосомы имеют радиус  $\sim 10$  нм, следовательно, гранулы продукта реакции могут маскировать рибосомы или полирибосомы. Поэтому только на основании приведенных сведений преждевременно утверждать, связана ли мелкогранулярная структура продукта реакции со специфической окраской свободных полирибосом или рибосом, либо с локальным скоплением молекул фермента в цитозоле. Окраска цитратом свинца клеток, не обработанных антителами, вы-



Рис. 4. Электронная микроскопия цитозоля клетки линии *MDBK*, не обработанной антителами. Видны многочисленные свободные рибо- и полисомы (указаны стрелками). ГЭР — цистерны гранулярного эндоплазматического ретикула; М — митохондрия. Препараты окрашены цитратом свинца.  $\times 56000$ .

Fig. 4. Electron microscopy of cytosol of *MDBK* cells nontreated with antibodies.

явила большое число свободных рибо- и полирибосом в цитоплазме (рис. 4), количественно коррелирующее с содержанием мелкогранулярного продукта реакции в клетках, подвергавшихся обработке специфическими антителами. Этот факт свидетельствует в пользу локализации ТРС на свободных полирибосомах, хотя не исключает локализацию фермента в цитозоле.

Можно предположить, что после синтеза на свободных полирибосомах, где, как известно, синтезируется большинство растворимых белков цитоплазмы [15], зрелые молекулы ТРС переходят в цитозоль и там обнаруживаются иммунохимически в виде интенсивно окрашенных аморфных отложений. По-видимому, клетки с наиболее интенсивно окрашенной цитоплазмой находятся в фазе клеточного цикла, характеризующейся максимальным содержанием вновь синтезированного зрелого фермента. Выявление ТРС на большом количестве свободных полирибосом можно объяснить тем, что моноклональное антитело АМ<sub>1</sub> специфично к антигенной детерминанте, находящейся на N-конце полипептидной цепи ТРС [4], а в поликлональном препарате шесть антител из девяти специфичны к N-участку [3]. Иными словами, в обоих случаях мы выявили, помимо зрелых молекул ТРС, и промежуточные продукты ее синтеза. Кроме того, нельзя исключить, что присутствие ТРС на всех полирибосомах объясняется тем, что при переносе аминокислотного остатка с триптофанил-тРНК на полипептидную цепь ТРС связана с ри-

босомой. Известно, что некоторые эукариотические аминоксил-тРНК-синтетазы образуют комплексы с рибосомной РНК и рибосомами [16] и, может быть, ТРС катализирует реакцию аминокислотирования тРНК, будучи связанной с рибосомой.

При использовании антител, истощенных на сорбенте с иммобилизованным гомогенным препаратом ТРС, в части фиксированных клеток можно обнаружить следовую мелкогранулярную окраску цитоплазмы и мембранносвязанных полирибосом. В большинстве клеток эта окраска слабо выделялась над общим фоном. Поскольку при обработке клеток конъюгатами *Fab* с пероксидазой хрена специфической окраски внутриклеточных структур не обнаружили, можно предположить, что эта следовая окраска является следствием неполного истощения антител.

Кроме двух описанных вариантов цитоплазматической локализации ТРС, в цитоплазме единичных клеток обнаружили очаговые скопления продукта реакции неправильной или округлой формы размером до 0,5 мкм, не ограниченные мембраной (иллюстрации не приводятся). Возможно, они являются морфологическим выражением мультиферментных комплексов (кодосом). В биохимических исследованиях триптофанил-тРНК-синтетазу в таких комплексах в большинстве случаев не выявили [17], что, по-видимому, связано с нестабильностью кодосом и частичным разрушением их в процессе гомогенизации.

Наряду с локализацией фермента в цитозоле обнаружили окрашивание полирибосом, связанных с мембранами цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), причем в самих цистернах продукт реакции отсутствовал (рис. 5, а, см. вклейку). Степень окраски мембранносвязанных полирибосом варьировала от клетки к клетке и даже внутри индивидуальной клетки.

Поскольку на мембранносвязанных полирибосомах синтезируются обычно секреторные или структурные белки [15], а аминоксил-тРНК-синтетазы, по имеющимся данным таковыми не являются, можно предположить, что присутствие ТРС на мембранносвязанных, также как и на свободных полирибосомах, необходимо для осуществления биосинтеза других белков. Не исключено, что ТРС сама может синтезироваться на полирибосомах, связанных с мембранами ГЭР и/или обладает неизвестными еще функциональными свойствами, требующими ее мембранной локализации. Разная степень окраски мембранносвязанных полирибосом пока не может быть однозначно истолкована.

В местах тесного контакта полирибосом, связанных с мембранами ГЭР, и митохондрий видна слабая окраска наружной мембраны последних (рис. 5, а), которую можно объяснить упомянутой ранее недостаточной разрешающей способностью иммунопероксидазного метода, так как при отсутствии контакта ГЭР и митохондрий она не обнаружена. Возможно, окрашенные полирибосомы маскируют просвет между цистернами ГЭР и наружной митохондриальной мембраной. Не исключено, однако, что тесный контакт полирибосом, связанных с ГЭР, и мембран митохондрий обусловлен синтезом ТРС для этих оргanelл, а очаговая окраска мембран митохондрий объясняется транспортом через них фермента [18, 19]. Отсутствие продукта реакции внутри митохондрий, скорее всего, является следствием слабого проникновения антител в митохондрии фиксированных клеток.

Окраску элементов комплекса Гольджи не выявили. При просмотре поперечных ультратонких срезов клеточного монослоя окраску ядер продуктом реакции обнаруживали только на моно- и полирибосомах, связанных с наружной ядерной мембраной (рис. 5, б). Наблюдаемая в световом микроскопе окраска ядер в отдельных интенсивно окрашенных клетках, следовательно, связана со светооптическим эффектом наложения окраски цитоплазмы на ядра в интактных клетках.

Обращает на себя внимание большое количество аутофагосом в клетках культуры. Отдельные аутофагосомы содержали различное количество продукта реакции (рис. 5, в), что связано с эндогенной перо-

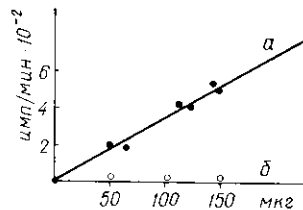
кислородной активностью этих органелл, так как при обработке фиксированных клеток только ДАБ также выявили подобную активность. Не исключено, однако, что указанная локализация продукта реакции объясняется протеолизом и/или процессингом ТРС в аутофагосомах [20].

Цитоплазма клеток часто содержала различное количество микрофиламентов. В области их скопления продукт реакции обычно отсутствовал (рис. 5, г).

Ввиду того, что вопрос о локализации ТРС в митохондриях решить однозначно с помощью иммуноэлектронно-микроскопического метода пока не удалось, мы использовали биохимический подход. Представлялось целесообразным исследовать митохондрии быка, а также челове-

Рис. 6. АТФ- $^{32}\text{P}$ -пирофосфатный обмен, катализируемый диализованным митохондриальным белковым экстрактом в присутствии (а) и отсутствии (б) *L*-триптофана. Инкубацию вели 12 мин при 37 °С.

Fig. 6. АТФ- $^{32}\text{P}$ -pyrophosphate exchange catalyzed by dialyzed mitochondrial protein extract in the presence (а) and absence (б) of tryptophan.



ка, поскольку известно, что в митохондриях клеток человека и быка присутствуют специфичные тРНК<sup>Trp</sup> [21] и, возможно, ТРС. Кроме того, интересно проследить за присутствием ТРС в цитозоле и митохондриях клеток с нарушенным биосинтезом белков и обменом аминокислот, в частности триптофана, который наблюдали в опухолях человека [22].

Были выделены митохондрии из поджелудочной железы быка и из ряда нормальных и опухолевых тканей человека. Метод, использованный для выделения митондрий, обеспечивает очистку этих органелл от цитоплазматических примесей, что видно из электрофореграмм митохондриальных и постмитохондриальных лизатов, представленных на рис. 1, б.

В препаратах митохондриальных экстрактов из клеток поджелудочной железы быка, диализованных для удаления эндогенных аминокислот, методом АТФ- $^{32}\text{P}$ -пирофосфатного обмена выявлена триптофанзависимая активность ТРС (рис. 6). Для выяснения иммунологической специфичности митохондриальной ТРС из бычьих клеток использовали препараты моноклональных и поликлональных антител к ТРС, выделенной из цитоплазмы клеток поджелудочной железы быка. Связывание моноклональных антител с митохондриальным ферментом в описанных условиях экспериментов не наблюдали (рис. 7 и 8), что косвенно подтверждает высокую степень очистки митохондриальных белков от цитоплазматических и может свидетельствовать об отсутствии взаимодействия моноклональных антител с митохондриальной ТРС.

В постмитохондриальных лизатах из поджелудочной железы (рис. 7) и из культуры клеток почки быка (рис. 7 и 8) в той же постановке опыта выявили белки с молекулярными массами 60000 и 180000, связывающиеся с моноклональными антителами (рис. 8), последний, вероятно, представляет собой тримерную форму фермента. Цепи с молекулярными массами ~40000 и 50000, скорее всего, продукты ограниченного протеолиза ТРС (рис. 7 и 8).

Обнаружили взаимодействие митохондриального фермента с АС к цитоплазматической ТРС и со специфическими кроличьими поликлональными антителами после абсорбции иммунопреципитатов на стафилококковой суспензии и разделения продуктов взаимодействия электрофорезом в денатурирующих условиях, а также иммуноблотингом (рис. 1, а, 8).

Оба метода позволили выявить полосы с молекулярными массами около 73000 и 60000, взаимодействующие в составе митохондриального лизата из поджелудочной железы быка с поликлональными ан-

тителами к цитоплазматической ТРС. Количественное соотношение этих белков в разных препаратах варьирует (рис. 1, а). Возможно, наблюдаемая картина является следствием протеолиза и/или процессинга белка 73000. Не исключена также возможность связывания с антителами к ТРС митохондриального белка другой природы. В постмитохондриальном лизате клеток поджелудочной железы быка белок 73000 не выявили, иммуноблоттингом обнаружили белки с молекулярными массами  $\sim 60000$  и  $\sim 180000$ . Таким образом, можно с уверенностью

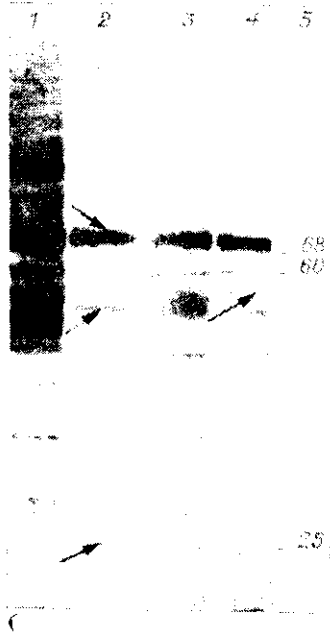


Рис. 7. Электрофорез в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях продуктов взаимодействия белков клеточных лизатов с мышечными моноклональными ( $AM_1$ ) антителами. В 1—3 пробах инкубировали с антителами по 60 мкг исследуемых белков, в 4—1 мкг. Каждая проба объемом 0,2 мл содержала по 5 мкг моноклональных антител. Пробы обрабатывали антимышинными кроличьими иммуноглобулинами. Гель окрашивали азотнокислым серебром. Постмитохондриальный (1) и митохондриальный (2) лизаты клеток поджелудочной железы быка; постмитохондриальный лизат клеток линии *MDBK* (3); ТРС из поджелудочной железы быка (4); молекулярные массы белковых маркеров в кДа (5). Стрелками указаны положения БСА, а также мышинных и кроличьих иммуноглобулинов, присутствующих во всех пробах.

Fig. 7. 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis of complexes of cellular proteins with mouse monoclonal antibodies under denaturing conditions.

сказать, что в изолированных митохондриях из клеток поджелудочной железы быка обнаружили ТРС, обладающую ферментативной активностью. Отсутствие взаимодействия моноклональных антител  $AM_1$  с этим митохондриальным белком свидетельствует скорее всего о том, что выявляемая в митохондриях ТРС отличается от цитоплазматической по меньшей мере по одной антигенной детерминанте. Связывание этого фермента с моноспецифическими поликлональными антителами к цитоплазматической ТРС свидетельствует об общих антигенных детерминантах у этих двух форм ТРС.

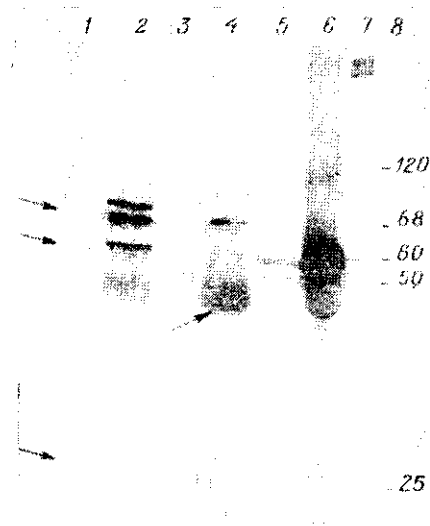
Известно, что 85—95% митохондриальных белков синтезируются на цитоплазматических рибосомах, в том числе в виде предшественников, транспорт которых через митохондриальную мембрану сопровождается их ограниченным протеолизом [23, 24]. Топографию синтеза этих белков связывают с полирибосомами ГЭР, находящегося в тесном контакте с митохондриями [15, 18, 19]. Можно предположить, что митохондриальная ТРС синтезируется на полирибосомах цистерн ГЭР, окружающих митохондрии. Электронно-микроскопически такую локализацию выявляли как моноклональными, так и поликлональными антителами. При транспорте через митохондриальную мембрану, который морфологически может проявляться в виде очаговой окраски наружной мембраны митохондрий (рис. 5, а), антигенная детерминанта для моноклонального антитела  $AM_1$ , локализованная на N-конце цитоплазматической ТРС, вероятно, отщепляется, а это должно привести к наблюдаемому нами отсутствию связывания митохондриального фермента с  $AM_1$  при сохранении связывания с поликлональными антителами. По данным реакции иммунопреципитации и иммуноблоттинга, содержание ТРС в постмитохондриальном лизате клеток поджелудочной железы быка составляет  $\sim 3\%$  от суммарного белка, а в митохондриях из

той же ткани и в лизате клеток *MDBK* — ~0,25 %. Обнаруженное нами высокое содержание ТРС в поджелудочной железе согласуется с данными по выделению фермента [5] и отражает высокую белоксинтезирующую активность этой ткани. Возможно также, что ТРС, помимо участия в синтезе триптофанил-тРНК, выполняет другие функции.

Во всех исследованных тканях человека иммуноблотингом обнаружен митохондриальный белок с молекулярной массой 60000, взаимодействующий со специфическими поликлональными антителами к ТРС

Рис. 8. Электрофорез в 12,5 % ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях продуктов реакции иммунопреципитации. Гель окрашивали Кумаси. Митохондриальный лизат поджелудочной железы быка; 250 мкг белка инкубировали с 5 мкг мышинных моноклональных антител (1) или с 50 мкг кроличьей АС (2); 20 мкг БСА инкубировали с 7 мкг АМ<sub>1</sub> (3) или 50 мкг БСА — с 0,1 мл кроличьей АС (6); 208 мкг белка лизата клеток линии *MDBK* инкубировали с 15 мкг АМ<sub>1</sub> (7); молекулярные массы белковых маркеров в кДа (8). Стрелками указаны положения БСА (68 кДа) тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов мыши и кролика, присутствующих во всех пробах.

Fig. 8. 12.5 % polyacrylamide gel electrophoresis of products of immunoprecipitation reaction under denaturing conditions.



быка (рис. 1, а). Белок с такой молекулярной массой обнаружили и при взаимодействии постмитохондриальных лизатов тканей человека с антителами к цитоплазматическому ферменту быка, кроме одного случая ткани миомы, в которой выявлены взаимодействующие белки с молекулярными массами 120000 и 180000 и практически не найден белок ~60000, в то время как митохондриальный белок 60000 из той же ткани обнаружен иммуноблотингом. По-видимому, обнаруженные особенности связаны только с цитоплазматической, а не митохондриальной формой ТРС клеток миомы. В связи с этим следует еще раз упомянуть о наличии в цитоплазме клеток человека и быка димерных и тримерных форм ТРС [5].

Перекрестная реакция антител к ТРС быка с ТРС человека подтверждается обнаруженным нами 50 %-ным ингибированием активности ТРС в постмитохондриальном лизате клеток плаценты человека кроличьей антисывороткой к ТРС быка в реакции АТР-[<sup>32</sup>P]-широфосфатного обмена. По данным других исследователей [25, 26], ТРС из тканей человека имеет молекулярную массу 116000–125000 и состоит из двух идентичных субъединиц, что соответствует нашим результатам.

Выявление нами ТРС в митохондриях эукариотических тканей согласуется с данными литературы о выделении некоторых аминоктил-тРНК-синтаз из митондрией [27] и хлоропластов высших организмов [28].

Авторы благодарят С. Ф. Берестеня за предоставление препарата моноклональных антител, А. С. Глейбермана за тестирование культуры клеток почки быка методом иммунофлюоресценции, Е. С. Залманзон за предоставление культуры клеток *MDBK*, Н. В. Энгельгардт за предоставленный препарат антикроличьих антител и Н. В. Теслер за помощь при выполнении работы.



IMMUNOMORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES  
ON INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF TRYPTOPHANYL-tRNA  
SYNTHETASE FROM HIGHER EUKARYOTES

*E. L. Paley, V. N. Baranov, N. E. Zinoviev, L. L. Kisselev*

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow  
Institute of Carcinogenesis, All-Union Cancer Research Centre, Academy of Medical  
Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Intracellular distribution of tryptophanyl-tRNA synthetase (TRS, EC 6.1.1.2) in cultivated bovine kidney cells *MDBK* was studied using purified monospecific polyclonal as well as monoclonal antibodies against cytoplasmic enzyme. Both light and electron microscopy was used to visualize the localization of antigen-antibody complexes within cells. The amount of TRS varied within a wide range in cytoplasm of various cells in the same culture. TRS was established to exist at free polyribosomes and as big aggregates in cytosol, at polysomes attached to membranes of rough endoplasmic reticulum as well as to external nuclear membrane. The product of cytochemical reaction was not revealed in nuclei, mitochondria, Golgi apparatus and in the region of microfilaments.

Biochemical studies of isolated mitochondria from bovine tissues and from normal and malignant human tissues by means of immunoblotting and immunoprecipitation showed the presence of TRS in these organelles. Human and bovine cytoplasmic and mitochondrial TRS share common antigenic determinants.

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Синтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК.— М.: Наука, 1984.— 408 с.
2. Шейнкер В. Ш., Фаворова О. О., Рохлин О. В. Иммунохимическое сравнение триптофанил-тРНК-синтетаз.— Молекуляр. биология, 1978, 12, № 3, с. 565—571.
3. Берестень С. Ф., Шейнкер В. Ш., Рохлин О. В. Иммунохимические свойства триптофанил-тРНК синтетазы и ее фрагментов.— Молекуляр. биология, 1978, 12, № 6, с. 1408—1419.
4. Моноклональные антитела к триптофанил-тРНК-синтетазе / С. Ф. Берестень, Т. А. Заргарова, С. В. Костров, О. О. Фаворова.— Молекуляр. биология, 1984, 18, № 5, с. 1407—1411.
5. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. Tryptophanyl-tRNA synthetase from beef pancreas.— In: Methods in Enzymology / Eds. K. Moldave, L. Grossman. N. Y.: Acad. press, v. 59, p. 234—257.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.— Nature, 1970, 227, N 5259, p. 680—685.
7. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels / W. Wray, T. Boulikas, V. P. Wray, R. Hancock.— Anal. Biochem., 1981, 118, N 1, p. 197—203.
8. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами.— М.: Наука, 1983.— 303 с.
9. Гурвич А. Ф., Кузовлева О. Б. Определение абсолютных количеств антител и их выделение в чистом виде с помощью белково-целлюлозных комплексов.— В кн.: Иммунохимический анализ / Под ред. Л. А. Зильбера. М.: Медицина, 1968.— 300 с.
10. Bustamante E., Soper Y. W., Pedersen P. L. A High-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria.— Anal. Biochem., 1977, 80, N 2, p. 401—408.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.— Anal. Biochem., 1976, 72, N 1, p. 248—254.
12. Parkhoff J., Verma I. M., Hunter T. Detection of transforming gene product in Moloney murine sarcoma virus transformed cells.— Cell, 1982, 29, N 2, p. 417—426.
13. Ultrastructural localization of alpha-fetoprotein regenerating mouse liver / N. V. Engelhardt, V. N. Baranov, M. N. Lazareva, A. I. Gusev.— Histochemistry, 1984, 80, N 4, p. 401—407.
14. Ordronneau P., Lindstrom P. P. M., Petrus Z. P. Four unlabelled antibody bridge techniques: A comparison.— J. Histochem. and Cytochem., 1981, 29, N 4, p. 1397—1404.
15. Гайцхоки В. С. Информационные РНК клеток животных.— М.: Медицина, 1980.— 199 с.
16. Roberts W. K., Olsen M. L. Studies on the formation and stability of aminoacyl-tRNA synthetase complexes from Ehrlich ascites cells.— Biochim. et biophys. acta, 1976, 454, N 3, p. 480—492.
17. Dang C. V., Johnson D. L., Yang D. C. H. High molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complexes in eukaryotes.— FEBS Lett., 1982, 142, N 1, p. 1—6.
18. Bhatnagar M. K., Singh A. Ultrastructure of turkey hepatocytes.— Anat. Rec., 1982, 202, N 4, p. 473—482.
19. Association between mitochondria and rough endoplasmic reticulum in rat liver / D. F. Montizano, J. Cascarano, C. B. Pickett, W. James.— Anat. Rec., 1982, 203, N 4, p. 441—450.

20. Dean R. T. Cellular degradative processes.— London: Chapman and Hall, 1978.— 120 p.
21. Sprinzl M., Gauss D. H. Compilation of tRNA sequences.— Nucl. Acids Res., 1984, 12, Suppl., p. 1—57.
22. Майнолов С. Е. Биохимические основы злокачественности.— Л.: Медицина, 1971.— 230 с.
23. Лузиков В. Н. Регуляция формирования митохондрий.— М.: Наука, 1980.— 317 с.
24. Hay R., Bohni P., Gasser S. How mitochondria import proteins.— Biochim. et biophys. acta, 1984 779, N 1. p. 65—87.
25. Penneys N. S., Muench K. H. Tryptophanyl-tRNA synthetase of human skin.— Clin. Res., 1971, 19, N 2, p. 581—582.
26. Penneys N. S., Muench K. H. Human placental tryptophanyl transfer ribonucleic acid synthetase. Purification and subunit structure.— Biochemistry, 1974, 13, N 3, p. 560—565.
27. Gabius H.-J., Cramer F. Purification and subunit structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from hen liver mitochondria.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, 106, N 2, p. 325—330.
28. Immunological evidence for structural differences between Euglena Gracilis chloroplast valyl- and leucyl-tRNA synthetase and their cytoplasmic counterparts / B. Colas, P. Imbault, V. Sarantoglou, J. H. Weil.— FEBS Lett., 1982, 141, N 2, p. 213—216.

Ин-т молекулярной биологии АН СССР, Москва  
Ин-т канцерогенеза ВОИЦ АМН СССР, Москва

Получено 13.08.84

УДК 577.123

## ИНГИБИРОВАНИЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СИНТЕЗА ДНК В ЯДРАХ ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMIDIUM* 2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-АМИНОНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТАМИ

М. К. Куханова, А. А. Краевский, Л. А. Терентьева, В. А. Рассказов

**Введение.** Мощными ингибиторами синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами ( $\alpha$  — из тимуса теленка,  $\beta$  — из печени крыс и I — из *E. coli*) в системах *in vitro*, являются даНТР [1], которые после связывания с комплексом ДНК-полимераза+ДНК реагируют с 3'-концом растущей цепи. В результате этой реакции остатки 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-фосфатов включаются в 3'-положение и тем самым терминируют рост новосинтезированной цепи.

Известно также, что 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозиды с теми же основаниями, что и даНТР, подавляют синтез ДНК в эмбрионах морского ежа в системе *in vivo* [2]. По предварительным данным механизм их действия аналогичен действию даНТР, т. е. аминонуклеозиды фосфорилируются и далее трифосфорилируются до даНТР и обрывают синтез ДНК по механизму терминации.

В этой работе представлены результаты исследований по действию четырех даНТР на синтез ДНК в изолированных ядрах, полученных из эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedium* на стадии подвижной бластулы. Показано, что даНТР являются ингибиторами репликативного синтеза ДНК и блокируют образование фрагментов Оказаки. Действие даНТР и агаТТР обратимо при добавлении избытка природного субстрата дТТР.

**Материалы и методы.** даАТР, даСТР, даГТР и даТТР синтезированы по [3] и предоставлены В. Е. Зайцевой; дАТР, дСТР, дГТР и дТТР производства НПО БАВ (Новосибирск); ddТТР фирмы «PL», США; NEM («Serva», США); [<sup>3</sup>H]дСТР фир-

Принятые сокращения: дНТР — 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты с основаниями аденин (дАТР), цитозин (дСТР), гуанин (дГТР) и тимин (дТТР); даНТР — 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-трифосфаты с основаниями аденин (даАТР), цитозин (даСТР), гуанин (даГТР) и тимин (даТТР); азТТР — 2'-дезоксид-2'-азидорботимидин-5'-трифосфат; ddТТР — 2',3'-дидезокситимидин-5'-трифосфат; агаТТР — 5'-трифосфат 1-( $\beta$ -D-арабинофуранозил)тимина; NEM — N-этилмалесимид.