



УДК 577.112.5

© 1993 Ц. А. Егоров, В. К. Казаков,
А. Х. Мусолямов, В. Н. Пустобаев, Г. К. Ковалева

ИДЕНТИФИКАЦИЯ N-КОНЦЕВОГО ПЕПТИДА БЫЧЬЕЙ ТРИПТОФАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Ключевые слова: триптофанил-тРНК-синтетаза; белки; первичная структура.

С помощью ковалентной хроматографии выделены и охарактеризованы N-концевой и другие триптические цистеинсодержащие пептиды бычьей триптофанил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1.2), структура которых была определена сочетанием плазменно-десорбционной масс-спектрометрии и автоматического метода Эдмана. Всего проанализировано шесть различных пептидов, содержащих семь остатков цистеина. Показано, что в зрелом ферменте N-концевая аминокислота ацетилирована и, по-видимому, это аланин. Сравнение аминокислотных последовательностей цистеинсодержащих пептидов с предсказанной ранее из последовательности кДНК первичной структурой фермента показывает некоторые различия между ними, что, по-видимому, свидетельствует о наличии изоформ фермента. Показано также, что сульфгидрильные группы не претерпевают каких-либо изменений в процессе выделения пептидов, а число остатков цистеина в пептидах может быть определено с высокой точностью измерением их масс до и после алкилирования 4-винилпиридином.

Аминоацил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1) катализируют высокоспецифическое присоединение аминокислот к соответствующим тРНК на дорибосомной стадии биосинтеза белка; они образуют самую многочисленную группу ферментов, участвующих в реализации генетической информации. Несмотря на сходные каталитические свойства, эти ферменты значительно различаются по четвертичной структуре и размеру субъединиц [1, 2]. К настоящему времени благодаря развитию генно-инженерных подходов установлена первичная структура более 20 аминоацил-тРНК-синтетаз [1, 3]. Все эти ферменты были выделены либо из прокариот, либо из одноклеточных эукариотических организмов. Это объясняется большими размерами молекул синтетаз высших эукариот и трудностями клонирования соответствующих генов. Лишь в последние годы определены первичные структуры четырех аминоацил-тРНК-синтетаз из млекопитающих [4—9]. Оказалось, что ферменты из высших эукариот обнаруживают ограниченную гомологию аминокислотных последовательностей с ферментами прокариот

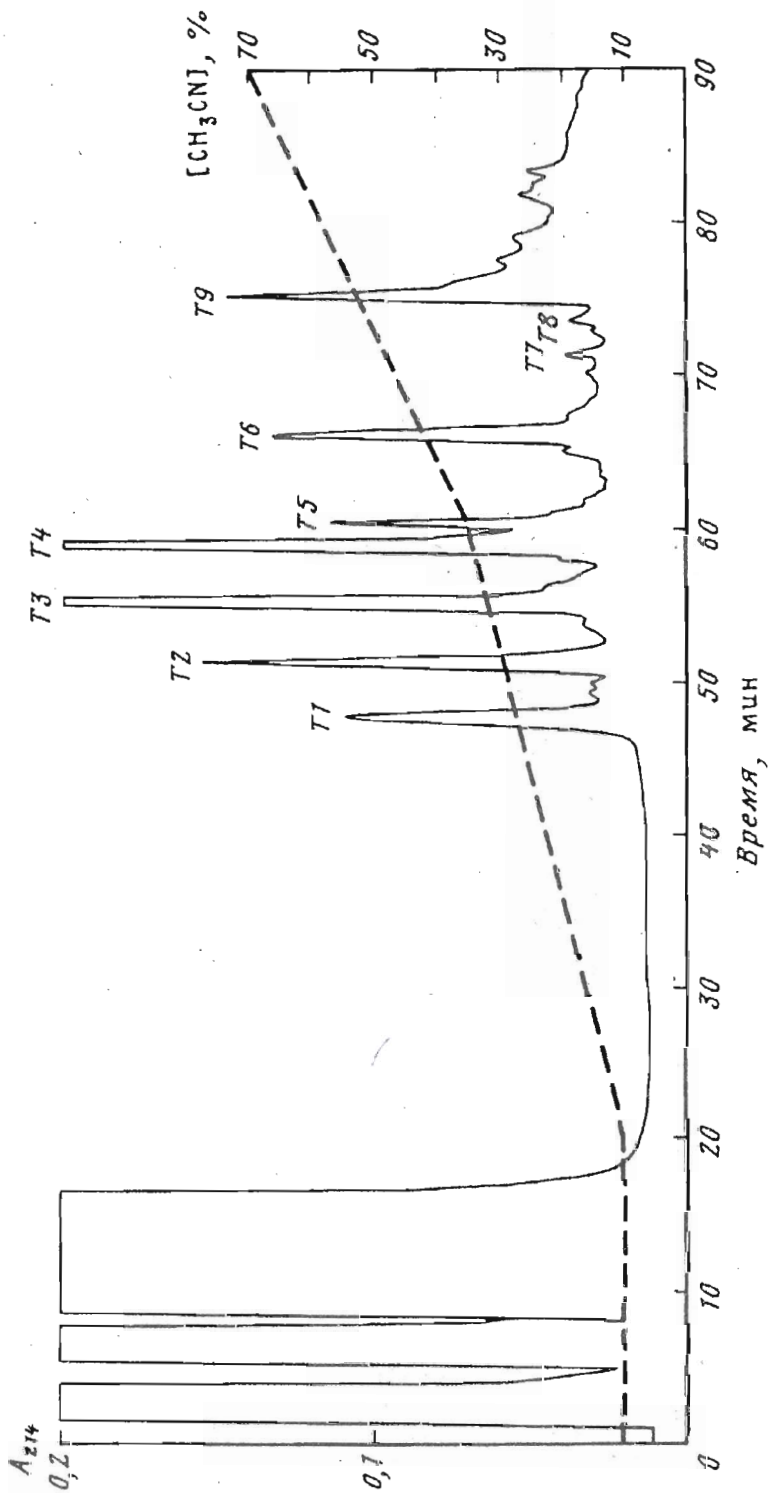
Сокращения: Тгр-РС — триптофанил-тРНК-синтетаза, ПДМС — плазменно-десорбционная масс-спектрометрия, TFA — трифторуксусная кислота.

даже одной и той же аминокислотной специфичности [3—11] и высокую гомологию внутри своего подцарства [4—11]. Для некоторых из них выявлено заметное структурное сходство с другими ферментами аппарата трансляции [8, 10].

Триптофанил-тРНК-синтетаза (Трп-РС; КФ 6.1.1.2, α_2 -тип) из поджелудочной железы быка состоит из двух, по-видимому идентичных, субъединиц, α -аминогруппы N-концевых остатков которых блокированы [12]. Природа блокирующей группы до сих пор оставалась неизвестной. Было найдено, что Трп-РС одновременно является металло- [13], фосфо- [14] и гликопротеином [15]. Фермент достаточно легко агрегирует, особенно при хранении, что, возможно, связано с полимеризацией белка посредством образования дисульфидных связей [16]. Каталитические свойства фермента достаточно хорошо изучены [12]. Однако результаты этих работ не были связаны с молекулярной структурой фермента. Недавно была определена нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующая Трп-РС из поджелудочной железы быка [7]. Предсказанная аминокислотная последовательность полипептидной цепи фермента состоит из 475 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 53 728 Да. Частично эта структура была также подтверждена сиквенсом пептидов, но были обнаружены некоторые расхождения [7, 17]. Кроме того, предсказанная аминокислотная последовательность не учитывает возможные посттрансляционные модификации фермента. Поэтому возникла необходимость поиска удобного метода пептидного картирования белка с целью уточнения его структуры, локализации функционально важных остатков аминокислот и участков посттрансляционных модификаций Трп-РС.

В настоящей работе мы поставили перед собой две задачи: 1) определить химическую природу N-концевой блокирующей группы Трп-РС, а также N-концевую аминокислотную последовательность этого белка; 2) найти условия подходящего ферментативного гидролиза белка. Для решения этих задач мы воспользовались методом ферментативного гидролиза белков, предварительно иммобилизованных на нерастворимом носителе по остаткам цистеина [18]. Этот метод оказался особенно удобен как для протеолиза больших белков и выделения цистеинсодержащих пептидов, так и для последующего разделения продуктов их фрагментации. Судя по предполагаемой аминокислотной последовательности Трп-РС, один из ее семи остатков цистеина находится вблизи N-конца полипептидной цепи фермента [7]. Благодаря этому представлялось возможным достаточно легко выделить N-концевой фрагмент, используя гидролиз иммобилизованного белка трипсином. С этой целью Трп-РС иммобилизовали на тиопропил-сефарозе 6В в денатурирующих условиях, используя приблизительно 300-кратный молярный избыток носителя по отношению ко всем сульфгидрильным группам белка. Было найдено, что количественная иммобилизация Трп-РС на носителе достигается в течение 4 ч, а гидролиз конъюгата трипсином, который оказался наиболее удобным для наших целей, происходит быстрее, чем гидролиз белка в растворе. Уже через 1 ч реакции можно было наблюдать появление всех цистеинсодержащих пептидов и исчезновение исходного белка, а через 6 ч — накопление пептидов неспецифического гидролиза Т7 и Т8 (см. ниже). Обычно для выделения пептидов конъюгат гидролизовали трипсином 2 ч. После окончания гидролиза сефарозу отмывали от неиммобилизованных пептидов, а затем цистеинсодержащие пептиды элюировали с носителя с помощью 2-меркаптоэтанола или дитиотреита.

На рисунке показано разделение фракций неалкилированных цистеинсодержащих триптических пептидов. Дальнейший анализ цистеинсодержащих пептидов показал высокую селективность и эффективность использованного нами метода. Результаты масс-спектрометрического анализа показывают, что сульфгидрильные группы пептидов в процессе выделения последних в градиенте ацетонитрила в кислой среде не претерпевают каких-либо изменений. Разница между измеренными и расчетными массами как для алкилированных, так и для неалкилированных пептидов составляет в среднем менее 2 ед. Это позволило в свою очередь определить число остатков цистеина в пептидах с высокой точностью (табл. 1). Таким образом, при необходимости цистеинсодержащие пептиды



Разделение неалкилированных цистеинсодержащих триплических пептидов бычьей триптофанил-тРНК-синтазы обращенно-фазовой хроматографией. Штриховой линией показан градиент ацетонитрила

могут быть алкилированы до или после хроматографического разделения (каждая фракция в отдельности или все вместе). Всего было выделено девять цистеинсодержащих пептидов (табл. 1), три из которых (Т3, Т4, Т9) представляют собой продукты неполного, а два других (Т7, Т8) — неспецифического гидролиза трипсином полипептидной цепи Трп-РС. В шести различных триптических пептидах (Т6, Т3, Т1, Т2, Т5, Т9) было найдено семь остатков цистеина, что соответствует их содержанию в аминокислотной последовательности Трп-РС, выведенной из кДНК [7], а также аминокислотному составу белка [19, 20].

Пептид Т6 (N-концевой). Секвенирование этого пептида до или после деформирования, так же как и целого белка, не дало положительных результатов. На этом основании было предположено, что пептид Т6 является N-концевым фрагментом белка. Однако измерение массы этого пептида показывает, что он отличается от соответствующего N-концевого фрагмента (1—29) предсказанной аминокислотной последовательности Трп-РС [7]. Разница масс между ними составляет 90,3 ед. (3047,4—2957,1; см. табл. 1). В то же время измеренная масса пептида Т6 и расчетная масса фрагмента (1—29) Трп-РС совпадают (с разницей всего лишь 0,5 ед.), если из расчетной массы фрагмента (1—29) вычесть массу остатка метионина и добавить массу ацетильной группы (3047,4—131,2 + 42,0 = 2958,2). Для подтверждения этого предположения была предпринята фрагментация алкилированного 4-винилпиридином пептида Т6 химическими и ферментативными методами с измерением масс и секвенированием образовавшихся пептидов (табл. 2). В случае расщепления пептида Т6 бромцианом идентифицирован только его С-концевой фрагмент (СВ2), который был частично секвенирован без предварительного разделения образовавшихся пептидов. Фрагмент СВ1 не был идентифицирован, возможно, потому, что он не несет положительного заряда. Из продуктов гидролиза алкилированного пептида Т6 протеиназой Glu-C с помощью ВЭЖХ (не показано) было выделено пять фрагментов (SP2, SP (2 + 1), SP3, SP4, SP (3 + 4)), которые были частично или полностью секвенированы (табл. 2). Эти результаты вместе с масс-спектрометрическим анализом показали полное совпадение с предполагаемой N-концевой аминокислотной последовательностью Трп-РС [7], кроме массы пептида SP (1 + 2). Однако измеренная масса пептида SP (1 + 2) (1643,0) хорошо согласуется с расчетной (1641,8), если из массы фрагмента (1—16) вычесть массу остатка метионина и добавить массу ацетильной группы.

В результате анализа различных фрагментов пептида Т6 суммарно была определена аминокислотная последовательность 25 остатков аминокислот с С-конца пептида, которая полностью совпадает с соответствующим участком предполагаемой структуры Трп-РС [7]. Отсюда масса неидентифицированного бромцианового фрагмента СВ1 составит 378,5 ед., если из найденной массы алкилированного пептида Т6 (3064,5) вычесть найденную массу фрагмента (5—29) (2704,0) и добавить массу воды. Полученная величина близка к расчетной массе предполагаемого фрагмента СВ1 (377,4) и хорошо согласуется с его предполагаемым аминокислотным составом, который можно вычислить, зная аминокислотный состав пептида Т6 и структуру фрагмента (5—29). Таким образом, можно предположить, что фрагмент СВ1 имеет аминокислотную последовательность (Ala, Asp) Met, N-концевой остаток которого (аланин или аспарагиновая кислота) ацетилирован.

Пептид Т9. Определение N-концевой аминокислотной последовательности этого пептида вплоть до 14-го остатка показало, что он соответствует участку полипептидной цепи предсказанной структуры Трп-РС, начинающегося с остатка 393 (табл. 1). Однако измеренная масса пептида Т9, равная 3458,3 ед. (3561,6 для алкилированного пептида), отличается от расчетной (2805,1) на 653,2 ед. для фрагмента (393 — 416), но лучше соответствует фрагменту Трп-РС (393—421) при разнице масс 15,7 ед. Это свидетельствует о том, что пептидная связь Lys-Leu (остатки 416—417), находящаяся в окружении остатков дикарбоновых кислот, не гидролизовалась трипсином. Для подтверждения этого факта и объяснения

Таблица I
Характеристика триптических цистеинсодержащих пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность ^а	Число остатков	M _r ^б		Число остатков цистеина ^в
			измеренная	расчетная	
T6	* MADMSNGEQGGSPLELFHNSIAAQCELVYR (1-29) AC-ADMSNGEQGGSPLELFHNSIAAQCELVYR	29 28	- 2957,7 (3064,5)	3047,4 2958,2 (3064,4)	1,01
T3	ATAGEDYKVDCCPQDPAPESGEGLDATEDDFYDPWYQTSSAK (57-101)	45	4667,5 (4772,8)	4668,8 (4774,9)	0,99
T1	** DIT-CGFDINK (226-235) DIACGFDINK	10 11	- 1209,1 (1313,0)	1124,3 1207,4 (1313,5)	0,98
T2	GIFGFTSDCICK (269-281)	13	1359,3 (1464,7)	1358,5 (1464,6)	0,99
T4	DRIDVQCLIPCAIDQDPYFR (303-322)	20	2366,8 (2577,0)	2366,6 (2578,9)	0,98

T5	TDVOCILPCAIQDPYFR (305-322)	18	2093,1 (2307,2)	2095,4 (2307,7)	2,02
T9	QFGNCVDVYSFMYLTFLEDDDKLEQIR (393-421) QFGNCVDVYSFMYLTFLEDDQKLEQIR	29 29	- 3458,3 (3561,6)	3442,6 3457,8 (3563,9)	0,98
T7	QFGCN... (393-?)	-	-	-	-
T8	QFGNCVDVYSF... (393-?)	-	-	-	-
	Число остатков в пептидах T6, T3, T1, T2, T4, T9	146			

а) Аминокислотные последовательности, определенные секвенированием пептидов, показаны жирным шрифтом, а предсказанные - курсивом. В случае различия (*) приведены обе структуры. Позиции пептидов в предсказанной аминокислотной последовательности Trp-PC [7] показаны в скобках. Результаты определения структуры пептидов T6 и T9 см. текст.

б) В скобках показаны величины M_r пептидов, алкилированных 4-винилпиридином; соответствующие расчетные данные также учитывают массу пиридилэтильной группы.

в) Вычислено путем деления разницы масс пептидов до и после алкилирования на массу пиридилэтильной группы (106,15).

Определение структуры N-концевого пептида Т6

Способ фрагментации	Пептид	Аминокислотная последовательность*	Число остатков	M _r	
				измеренная	расчетная
Расщепление CNBr	CB1	Ac-ADM **	3	-	377,4
	CB2	SNCEQCCGSPLELFHSLAAQGLVLR	25	2704,0	2704,0
Переваривание протеиназой Glu-C	SP1	Ac-ADMSNGE **	7	-	764,7
	SP2	QCCGSPLE	8	892,7	893,9
	SP(+2)	Ac-ADMSNGEQCCGSPLE	15	1643,0	1641,8
	SP3	LFHSLAAQCE	10	1070,9	1072,2
	SP4	LVR	3	387,2	386,5
	SP(+4)	LFHSLAAQGLVLR	13	1441,5	1440,7
	T6	Ac-ADMSNGEQCCGSPLELFHSLAAQGLVLR	28	3064,5	3064,4
Аминокислотный состав					
		D 0,8; S 2,9; E 4,8; P 1,1; G 4,4; A 2,9; V 0,9;			
		C 0,9; M 0,7; I 0,9; L 2,8; F 1,0; H 1,1; R 0,9			

* Аминокислотные последовательности, определенные секвенированием пептидов, показаны жирным шрифтом, а предсказанные — курсивом. Измеренные и расчетные массы пептида Т6 и его фрагментов даны с учетом массы пирролидинольной группы.

** Не идентифицирован.

различий, связанных с разницей масс, пептид Т9 расщепляли бромцианом и после разделения образовавшихся пептидов ВЭЖХ (не показано) секвенировали его С-концевой фрагмент. В результате удалось определить последовательность 12 аминокислот, найти одну замену Asp → Gln (разница масс равна 13,04 ед.) и подтвердить, что связь Lys-Leu не гидролизовалась. Можно предположить, что последовательность четырех неидентифицированных аминокислот пептида Т9, т. е. EQIR (табл. 1), совпадает с фрагментом (393—421) Тгр-РС, так как массы пептида Т9 до или после алкилирования хорошо согласуются с расчетными с учетом найденной нами замены. Следует отметить, что замена Asp → Gln была обнаружена и в работе [7].

Пептид Т1 был полностью секвенирован. Он отличается от соответствующего фрагмента предсказанной структуры Тгр-РС (226—235) одной заменой и одной вставкой (табл. 1). Такой же пептид (остатки 226—235) был получен в работе [7] при изучении структуры некоторых пептидов фермента.

Пептид Т2. Его структура полностью совпадает с соответствующим фрагментом (269—281) предсказанной структуры фермента.

Пептиды Т4 и Т5 отличаются друг от друга только наличием дополнительных двух остатков с N-конца в пептиде Т4. Происхождение пептида Т4 можно объяснить тем, что соседство около остатка Arg-304 остатков дикарбоновых аминокислот замедляет гидролиз пептидной связи трипсином. Его структура не отличается от фрагмента (303—322) предполагаемой структуры белка. Выход пептида Т5, судя по его поглощению (рисунок), существенно меньше выхода пептида Т4.

Заключение

В настоящей работе выделено и охарактеризовано шесть различных пептидов (Т6, Т3, Т1, Т2, Т4, Т9), которые в сумме содержат 146 аминокислотных остатков, включая семь остатков цистеина. Из них секвенировано 107 аминокислотных остатков. Сочетание метода селективного выделения цистеинсодержащих пептидов с ВЭЖХ и ПДМС оказалось эффективным как для выделения и характеристики N-концевого фрагмента Тгр-РС, так и для разделения остальных пептидов методами ВЭЖХ. Принимая во внимание наши данные и предсказанную структуру фермента [7], можно заключить, что N-концевым остатком полипептидной цепи белка, по-видимому, является аланин, NH₂-группа которого ацетилирована. Эти заключения находятся в хорошем соответствии с данными по первичным структурам секретируемых белков эукариот [21—24]. Обнаруженные нами различия между результатами белкового секвенса и предсказанной аминокислотной последовательностью Тгр-РС [7] не единственные. Ранее другими авторами была определена структура шести пептидов данного фермента, которые в сумме содержат 100 аминокислотных остатков [17]. При сопоставлении структуры этих пептидов с предсказанной аминокислотной последовательностью белка также обнаруживаются некоторые различия. Это свидетельствует о возможном существовании изоформ фермента. Результаты этой работы создают основу для дальнейшего структурно-функционального анализа фермента.

Экспериментальная часть

Триптофанил-тРНК-синтазу выделяли из поджелудочной железы быка, как описано ранее [12, 17].

В настоящей работе использованы следующие реактивы: тиопропил-сефароза 6В (Pharmacia LKB Biotechnology, Швеция); свиной трипсин (Novo, Дания); трифторуксусная кислота (Клауер, Германия); трис-гидрохлорид, натриевая соль EDTA, дитиотреит, бикарбонат аммония, гуанидингидрохлорид (Sigma, США); ацетонитрил марки «для хроматографии», HCl (Merck, Германия); 2-меркаптоэта-

нол (Bio-Rad, США); бромциан, 4-винилпиридин (Fluka, Швейцария). Деионизированную воду получали с помощью системы «Milli Q» (Millipore, США).

Подготовка тиопропил-сефарозы 6В. Носитель после 15 мин набухания в воде промывали сначала 20-кратным объемом воды, а затем уравнивали 5-кратным объемом 0,2 М трис-НСI-буфера (рН 8,0) в 5 М гуанидингидрохлориде, содержащего 1 мМ EDTA (буфер В). Буфер В очищали фильтрованием через мембрану (0,2 мкм) и патрон Ser-Pak C18 (Millipore, США). Обычно для иммобилизации 300 мкг фермента брали 100 мкг сухого носителя, что приблизительно соответствует 300 мкл набухшего геля.

Иммобилизация фермента на тиопропил-сефарозе 6В. Обычно 1,2 мг (около 20 нмоль) лиофильно высушенного белка растворяли в 1,0 мл буфера В и добавляли к 1,0 мл предварительно уравновешенного носителя. Суспензию перемешивали (20 об/мин) на ротамиксере RK-12 (Нето, Дания) при комнатной температуре в течение 4 ч. Полноту иммобилизации контролировали обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для этого из реакционной смеси отбирали аликвоты с интервалом 1 ч, которые анализировали на колонке Aquapore RP-300 размером $4,6 \times 100$ мм (Brownlee Lab., США) в градиенте ацетонитрила (30—70% за 40 мин). Условия хроматографии: буфер А — 0,1 об. % TFA в воде, буфер В — ацетонитрил, содержащий 0,08% TFA; скорость потока 0,5 мл/мин; детектирование осуществляли при 214 и 254 нм. В этих условиях фермент элюировался при 45% ацетонитрила.

Гидролиз иммобилизованного фермента трипсином. Конъюгат переносили в соответствующего объема наконечник для автоматических пипеток или пластиковый шприц, используя в качестве фильтра стекловату, промывали 2-кратным объемом буфера В и уравнивали 10-кратным объемом аммоний-дикарбонатного буфера, рН 8,0 (буфер Г). Затем гель из наконечника выдавливали в стеклянный флакончик, предварительно удалив фильтр, добавляли (или отбирали) при необходимости буфер Г с тем, чтобы соотношение конъюгат — буфер было приблизительно 1 : 2. К суспензии добавляли трипсин в соотношении фермент — субстрат 1 : 100. Гидролиз вели при перемешивании (20 об/мин) при 37° С в воздушном термостате. По окончании гидролиза суспензию переносили в наконечник. «Колонку» промывали двумя объемами буфера В и объединенную фракцию анализировали ВЭЖХ. «Колонку» дополнительно промывали тремя объемами буфера В и фильтрат отбрасывали.

Снятие цистеинсодержащих пептидов с носителя осуществляли во флакончике, используя 100-кратный молярный избыток восстанавливающего агента (2-меркаптоэтанола или дитиотреита) по отношению к активированным группам носителя. После 30 мин инкубации при перемешивании суспензию переносили в наконечник, собирали фильтрат и промывали двумя объемами буфера В. Объединенный фильтрат непосредственно наносили на колонку с целью разделения пептидов или их обессоливания.

Хроматография и обессоливание пептидов. Цистеинсодержащие пептиды разделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке Aquapore RP-300 размером $4,6 \times 100$ мм в градиенте ацетонитрила (10—40% за 40 мин и 40—70% за 30 мин) при скорости 0,5 мл/мин. Колонку предварительно уравнивали 10% буфером В и градиентное элюирование пептидов начинали только тогда, когда из колонки вымывались соли, избыток восстанавливающего агента и побочные продукты реакции (около 15 мин). Обессоливание смеси цистеинсодержащих пептидов для последующего их алкилирования проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на той же колонке. После нанесения смеси пептидов на колонку пептиды после полного вымывания солей элюировали «коротким» градиентом ацетонитрила (10—70% за 10 мин). Пептидные фракции собирали, лиофилизировали или упаривали на вакуумной центрифуге Speedvac (Savant, США). Детектирование осуществляли при 214 и 254 нм.

Алкилирование отдельных цистеинсодержащих пептидов или их смеси после обессоливания выполняли как описано в работе [21]. Для этого пептиды растворяли в 50 мкл буфера В, добавляли 1 мкл водного раствора дитиотреита

(1,4 мкмоль/мкл) и инкубировали смесь 10 мин. Затем к смеси добавляли 1 мкл 4-винилпиридина, тщательно перемешивали и инкубировали 5 мин. Реакционную смесь немедленно наносили на колонку. Пептиды элюировали градиентом ацетонитрила после вымывания избытка реагентов (15—20 мин), как описано выше.

Расщепление пептидов бромцианом. Пептиды растворяли в 50 мкл 80% ТФА и добавляли 1 мкл 0,5 М раствора бромциана в ацетонитриле. Смесь инкубировали в атмосфере аргона в темноте 18 ч, затем к смеси добавляли 150 мкл воды и лиофилизировали. Алкилированные пептиды растворяли в 50 мкл буфера В и наносили на колонку для их разделения.

Деформирование фермента и пептида Т6 осуществляли в 25% ТФА при 55° С в течение 4 ч или в 80% ТФА при 20° С в течение 16 ч в атмосфере аргона. Белок предварительно растворяли в 80% ТФА, а затем разбавляли водой. По окончании реакции образцы лиофилизировали. Белок и пептид растворяли в 15 мкл 80% ТФА и 30% ацетонитриле, содержащем 0,1% ТФА, и наносили на мембрану секвенатора.

Для аминокислотного анализа пептиды гидролизуют 5,7 н. HCl и анализируют в виде фенолтиокарбамоильных производных на колонке Ultrasphere-ODS (Beckman, США) размером 4,6 × 250 мм, как описано [22].

Секвенирование пептидов и белка осуществляли на секвенаторе модели 816 (Knauer, Германия), снабженном анализатором Pth-производных аминокислот модели 120A (Applied Biosystems, Inc., США) по программе изготовителя.

Масс-спектры пептидов получали на времяпролетном масс-спектрометре с плазменной десорбцией продуктами деления калифорния-252 производственного объединения «Электрон» (г. Сумы, Украина). Пептиды (200—500 пмоль) растворяли в 0,1% ТФА и наносили на подложку из нитроцеллюлозы на твердом диске. Число распадов калифорния-252 равнялось от 150 до 350 тыс. Точность определения масс пептидов составляет 0,15% от молекулярной массы исследуемого образца. Расчет масс пептидов и компьютерный поиск масс последних осуществляли по программе GPMA.

Авторы благодарят чл.-кор. РАН Л. Л. Киселева за постоянный интерес и поддержку этой работы и д-ра П. Хойропа из отдела молекулярной биологии Университета г. Оденс (Дания) за предоставление программы GPMA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schimmel P. R. // Annu. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 125—158.
2. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоксил-тРНК. М.: Наука, 1984. 408 с.
3. Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. // Nature. 1990. V. 347. № 6289. P. 203—206.
4. Tsui F. W. L., Siminovich L. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 15. № 8. P. 3349—3367.
5. Mirande M., Waller J.-P. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 2. P. 842—847.
6. Jacovo-Molena A., Peterson R., Yang D. C. H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 28. P. 16608—16612.
7. Garret M., Pajot B., Trezequet V., Labouesse J., Merle M., Gandar J.-C., Benedetto J.-P., Sallafranque M.-L., Alterio J., Guequen M., Sarger C., Labouesse B., Bonnet J. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 31. P. 7809—7817.
8. Fett R., Knippers R. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 3. P. 1448—1455.
9. Frolova L. Yu., Sudomina M. A., Grigorieva A. Y., Zinovieva O. L., Kisselev L. L. // Gene. 1991. V. 109. № 2. P. 291—296.
10. Raven N., Borrello F., Amin J., Horwitz R., Fraster D., Plotz P. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 5. P. 1075—1081.
11. Schimmel P. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. № 1. P. 1—3.
12. Kisselev L. L., Favorova O. O., Kovaleva G. K. // Meth. Enzymol. 1979. V. 59. Part G. P. 234—257.
13. Kiselev L. L., Favorova O. O., Nurbekov M. K., Dmitrienko S. G., Engelhardt W. A. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 120. № 3. P. 511—517.

14. Paley E. L., Baranov V. N., Alexandrova N. M., Kiselev L. L.//Exp. Cell Res. 1991. V. 195. № 1. P. 66—78.
15. Kovaleva G. K., Zheltova A. O., Nikitushkina T. V., Egorov T. A., Musoljamov A. Ch., Kiselev L. L.//FEBS Lett. 1992. V. 309. № 3. P. 337—339.
16. Тузииков Ф. В., Тузиикова Н. А., Вавилин В. И., Зиновьев В. В., Малыгин Е. Г., Фаворова О. О., Заргарова Т. А., Судомина Н. А., Киселев Л. Л.//Молекулярн. биология. 1991. Т. 25. № 3. С. 740—751.
17. Заргарова Т. А., Ковалева Г. К., Фаворова О. О., Левина Н. Б., Тележинская И. Н.//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1307—1312.
18. Egorov Ts. A.//Methods in Protein Sequence Analysis//Eds H. Jornvall, J.-O. Hoog, A.-M. Gustavsson. Basel: Birkhauser Verlag, 1991. P. 177—185.
19. Epely S., Gross C., Laboness J., Lemaire G.//Eur. J. Biochem. 1976. V. 61. № 1. P. 139—146.
20. Lemaire G., Gross C., Epely S., Kaminsky M., Labouese B.//Eur. J. Biochem. 1975. V. 51. № 1. P. 237—252.
21. Tomkinson A. E., Lasko D. D., Daly G., Lindahl T.//J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 21. P. 12611—12617.
22. Burstein Y., Schechter I.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 716—720.
23. Tsunasawa S., Sakiyama F.//Meth. Enzymol. 1984. V. 106. P. 165—170.
24. Persson B., Flinta Ch., von Heijne G., Jornvall H.//Eur. J. Biochem. 1985. V. 152. № 3. P. 523—527.

Получила в редакцию
31.III.1993

*Ts. A. Egorov, V. K. Kazakov, A. Kh. Musolyamov,
V. N. Pustobaev, G. K. Kovaleva*

IDENTIFICATION OF THE N-TERMINAL PEPTIDE OF THE BOVINE TRYPTOPHANYL-tRNA-SYNTHEASE

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow*

By means of covalent chromatography on thiopropyl-sepharose 6B the N-terminal, as well as other tryptic cysteine-containing peptides of the bovine tryptophanyl-tRNA-synthetase (EC 6.1.1.2) were purified and characterized, their structures being determined by a combination of plasma desorption mass spectrometry and peptide sequencing. In total, six different peptides containing seven cysteine residues were analysed. The N-terminal amino acid (presumably, alanine) was shown to be acetylated in the nature enzyme amino acid sequences of some cysteine-containing peptides proved to differ from those deduced from the cDNA structure, thus indicating the presence of the enzyme's isoforms. The purification does not affect the peptides' sulphhydryl groups. The number of cysteine residues in the peptides could be determined with a high accuracy by measuring their masses before and after alkylation with 4-vinylpyridine.