

($M^\circ \sim 11$ kcal/mol) and entropy $\Delta S^\circ \sim -5$ cal·mol⁻¹·degree⁻¹. Association constant of Phe-tRNA^{Phe} measured at 0°C and during blocking of P-site with a unsplitable analog of peptidyl-tRNA is in good agreement with that dependence.

УДК 577.217:357.32

Л. Л. Иванов, З. П. Мартинкус, Р. Р. Стапуленис, Л. Ю. Лукошявичюс, А. В. Лекис

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕЙЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В БЕЗРИБОСОМНЫХ ЭКСТРАКТАХ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА И МИОКАРДА СВИНЬИ

Изучено распределение лейцил-тРНК синтетазной активности в безрибосомных экстрактах печени кролика и миокарда свиньи. При ишемии миокарда в обоих исследованных экстрактах отмечено частичное перераспределение активности этого фермента между фракциями различной молекулярной массы. Высказывается предположение о том, что процессы ассоциации — диссоциации аминоксил-тРНК синтетаз могут участвовать в регуляции скорости белкового синтеза в эукариотических клетках.

Введение. Известно, что эукариотические аминоксил-тРНК синтетазы (АРСазы) в отличие от прокариотических ферментов функционируют в составе высокомолекулярных комплексов [1, 2], образуют ассоциаты с рибосомами и микросомами [3—5], обладают высоким сродством к высокомолекулярной РНК [3—6]. Предполагается, что эти эволюционно приобретенные свойства АРСаз необходимы для их частичной компартиментализации в клетке в местах функционирования [4, 5]. Кроме того, в последние годы установлено, что при некоторых физиологических и патологических изменениях в организме, приводящих к нарушению биосинтеза белка, имеет место разнонаправленное перераспределение АРСаз между комплексами различной молекулярной массы либо между комплексами и фракцией свободных ферментов [7—12].

В данной работе проведено изучение распределения лейцил-тРНК синтетазной активности в безрибосомных экстрактах печени кролика и миокарда свиньи в норме и на модели нарушения биосинтеза белка — экспериментальном инфаркте миокарда кролика (ЭИМ) и тотальной ишемии миокарда свиньи, которые, как мы установили ранее, сопровождаются изменением активности компонентов аппарата трансляции [13—15].

Материалы и методы. Методики воспроизведения ЭИМ у кролика и тотальной ишемии миокарда свиньи описаны в работах [14, 16].

Получение безрибосомных экстрактов. Ткань печени либо миокарда гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в двух объемах буфера А (20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 30 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 250 мМ сахароза, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Гомогенат центрифугировали 15 мин при 27000 g и 90 мин при 105000 g и отбирали надосадочную жидкость (безрибосомный экстракт).

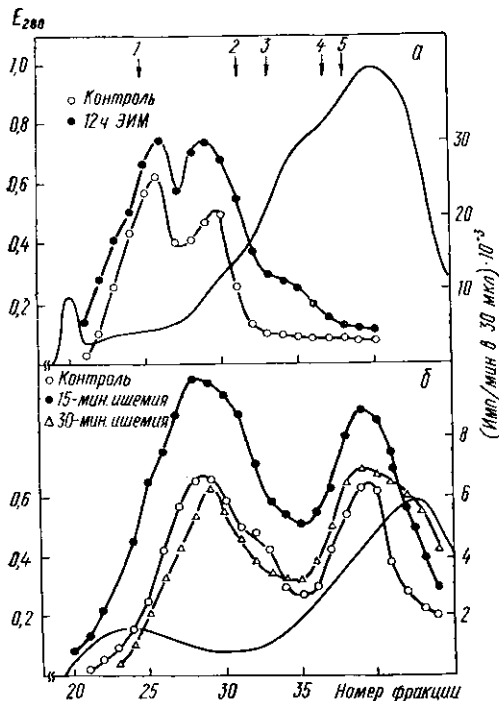
Хроматография на сефарозе 6В. 4 мл безрибосомного экстракта наносили на колонку с сефарозой 6В («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) (16××750 мм), уравновешенную буфером А. Элюцию проводили тем же буфером. Объем фракций — 3 мл, скорость элюции 10 мл/ч.

Молекулярную массу полученных белковых фракций определяли по калибровочной кривой, используя маркеры со следующей молекулярной массой: альдолаза — 158000, каталаза — 232000, ферритин — 440000, тироглобулин — 669000, декстран голубой — 2000000.

Активность лейцил-тРНК синтетазы (лейРС) определяли по начальной скорости реакции аминокислотирования тРНК при насыщающих концентрациях субстратов. Реак-

ционная смесь содержала в объеме 100 мкл: 150 мМ трис-НСI, рН 7, 6, 15 мМ КСI, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ АТФ, 1 мМ ¹⁴С-лейцин, 150 мкг суммарного препарата тРНК и 2—50 мкг фермента. После инкубации при температуре 25 °С в течение 5 мин к пробам добавляли двойной объем 10 %-ной трихлоруксусной кислоты. Осадки промывали на нитроцеллюлозных фильтрах и определяли радиоактивность проб в толуоловом сцинтилляторе.

Результаты и обсуждение. При гель-хроматографии безрибосомного экстракта печени кролика на сефарозе 6В лейцил-тРНК синтетазная активность распределяется, в основном, между фракциями с молекулярной массой 1 820 000 и 840 000 (рисунок, а).



В данных фракциях, представляющих собой высокомолекулярные комплексы АРСаз, наряду с лейцил-тРНК синтетазой содержатся аргинил-, глутамил-, изолейцил-, лизил- и валил-тРНК синтетазы (табл. 1).

Распределение лейцил-тРНК синтетазной активности безрибосомных экстрактов печени кролика (а) и миокарда свиньи (б) при гель-хроматографии на сефарозе 6В. Стрелками указаны положения маркеров: 1 — декстран голубой; 2 — тироглобулин; 3 — ферритин; 4 — каталаза; 5 — альдолаза

Distribution of leucyl-tRNA synthetase activity in postribosomal extracts from the rabbit liver (a) and pig myocardium (b) under gel chromatography on Sepharose 6B. Arrows point out the position of the markers: 1 — dextran blue, 2 — thyroglobulin, 3 — ferritin, 4 — catalase, 5 — aldolase

При хроматографии аналогичного экстракта миокарда свиньи лейцил-тРНК синтетазная активность обнаруживается во фракциях с молекулярной массой 970 000 и 132 000 (рисунок, б). Высокомолекулярная фракция, как и в случае печени кролика, представляет собой комплекс АРСаз (табл. 1). Низкомолекулярная фракция соответствует области элюции свободной лейРС. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в печени кроликов лейРС содержится, в основном, в высокомолекулярных комплексах АРСаз, а в миокарде свиньи —

Таблица 1

Состав высокомолекулярных комплексов АРСаз печени кроликов и миокарда свиньи
The composition of high-molecular-weight aminoacyl-tRNA synthetases complexes from rabbit liver and pig myocardium

Аминоацил-тРНК синтетаза	Активность, пмоль аминоксил-тРНК/мин на 1 мг белка		
	Печень кролика		Миокард свиньи
	Комплекс АРСаз, 1820000	Комплекс АРСаз, 840000	Комплекс АРСаз, 970000
Аргинил-тРНК синтетаза	793	93	121
Валил-тРНК синтетаза	434	108	50
Глутамил-тРНК синтетаза	469	89	68
Изолейцил-тРНК синтетаза	824	175	283
Лейцил-тРНК синтетаза	1039	287	291
Лизил-тРНК синтетаза	916	93	282

как в составе комплекса, так и в свободном состоянии. Можно предположить, что в клетках печени процессы компартиментализации АРСаз более резко выражены, чем в миокардиальных клетках. Следует отметить, что установленный нами состав высокомолекулярных комплексов АРСаз практически полностью соответствует моделям структурной организации этих ферментов в клетках млекопитающих [1—3].

Результаты изучения уровня активности лейРС во фракциях различной молекулярной массы безрибосомных экстрактов печени кролика и миокарда свиньи представлены в табл. 2. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованный фермент преимущественно содержится во фракциях с более высоким значением молекулярной мас-

Таблица 2

Лейцил-тРНК синтетазная активность во фракциях различной молекулярной массы безрибосомных экстрактов печени кролика и миокарда свиньи (усреднение по 6—8 опытам)

Leucyl-tRNA synthetase activity of different molecular mass fractions from postribosomal rabbit liver and pig myocardium extracts (mean values from 6—8 investigations)

Показатель	Активность, пмоль лейцил-тРНК/мин на 1 мг белка			
	Печень кролика		Миокард свиньи	
	Комплекс АРСаз, 182000	Комплекс АРСаз, 84000	Комплекс АРСаз, 97000	Фракция свободной лейРС, 13200
Контроль	1038,6±11,0	286,5±23,2	291,2±7,5	61,6±5,5
12 ч ЭИМ	1233,8±60,5	533,0±67,6	—	—
15 мин ишемии миокарда	—	—	350,8±10,3	55,1±3,2*
30 мин ишемии миокарда	—	—	216,1±21,4	86,9±3,4

* Изменения, статистически недостоверные.

сы. По-видимому, комплекс меньшего размера (в случае печени кролика) и свободный фермент (в случае миокарда свиньи) являются продуктами диссоциации более тяжелого комплекса. Через 12 ч после воспроизведения ЭИМ наряду с увеличением лейцил-тРНК синтетазной активности во фракциях обоих комплексов печени кролика наблюдается ее относительное перераспределение из тяжелого комплекса в более легкий (табл. 2). Что касается миокарда свиньи, то при 15-минутной ишемии отмечено увеличение активности лейРС в составе высокомолекулярного комплекса и незначительное уменьшение во фракции свободного фермента. При 30-минутной ишемии эти изменения носят противоположный характер (табл. 2). Из вышеизложенного следует, что в зависимости от продолжительности ишемии происходят перераспределения активности лейРС между фракциями высокомолекулярного комплекса и свободного фермента. Однако полученные результаты не позволяют однозначно утверждать, что при ишемии миокарда лейРС перераспределяется между фракциями различной молекулярной массы. Так, нельзя исключить, что изменение активности фермента в исследованных фракциях связано с влиянием внутриклеточных факторов, например, таких, как неорганическая пирофосфатаза, изменение активности которой при ишемии миокарда мы ранее установили [15], а также регулируется путем фосфорилирования — дефосфорилирования, как некоторые другие АРСазы эукариот [17].

Тем не менее результаты нашей работы, а также данные литературы [7—12] позволяют предположить, что наряду с изменением сродства к РНК [4—6] процессы ассоциации — диссоциации АРСаз могут участвовать в регуляции скорости белкового синтеза в эукариотических клетках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dang C. V., Dang C. V. Multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases: an essence of being eukaryotic // *Biochem. J.*—1986.—**239**, N 2.—P. 249—255.
2. Dang C. V., Dang C. V. Higher eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases in physiologic and pathologic states // *Mol. and Cell. Biochem.*—1986.—**71**, N 2.—P. 107—120.
3. Dang C. V., Johnson D. L., Yang D. C. H. High molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complex in eukaryotes // *FEBS Lett.*—1982.—**142**, N 1.—P. 1—6.
4. Федоров А. Н., Альжанова А. Т., Овчинников Л. П. Ассоциация эукариотических аминоксил-тРНК-синтетаз с полирибосомами // *Биохимия.*—1985.—**50**, № 10.—С. 1639—1645.
5. Spirin A. S., Ajlkhozhin M. A. Informosomes and polyribosome-associated proteins in eukaryotes // *Trends Biochem. Sci.*—1985.—**10**, N 4.—P. 162—165.
6. Alzhanova A. T., Fedorov A. N., Ovchinnikov L. P. Aminoacyl-tRNA synthetases of rabbit reticulocytes with and without the ability to bind high-Mr RNA // *FEBS Lett.*—1982.—**144**, N 1.—P. 149—153.
7. Takahashi R., Mori N., Goto S. Alteration of aminoacyl-tRNA synthetases with age: accumulation of heat-labile enzyme molecules in rat liver, kidney and brain // *Mech. Ageing and Develop.*—1985.—**33**, N 1.—P. 67—75.
8. Studies on particulate and soluble forms of aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver and hepatomas / U. Del Monte, G. Neri Cini, S. Capaccioli et al. // *Med. and Biol. Environ.*—1981.—**9**, N 1.—P. 375—379.
9. Effects of liver regeneration on tRNA contents and aminoacyl-tRNA synthetase activities and sedimentation patterns / U. Del Monte, S. Capaccioli, G. Neri Cini et al. // *Biochem. J.*—1986.—**236**, N 1.—P. 163—169.
10. Enger M. D., Ritter P. O., Hampel A. E. Altered aminoacyl-tRNA synthetase complexes in G₁-arrested chinese hamster ovary cells (CHO) // *Biochemistry.*—1978.—**17**, N 12.—P. 2435—2438.
11. Klekamp M., Pakuski E., Hampel A. Reformation of leucyl-tRNA synthetase complexes in revertants from CHO mutant ts H 1 // *Somat. Cell. Genet.*—1981.—**7**, N 6.—P. 725—735.
12. Hampel A. E., Ritter P. O., Enger M. D. A physically altered leucyl-tRNA synthetase complex in a CHO cell mutant // *Nature.*—1978.—**276**, N 5690.—P. 844—845.
13. тРНК и аминоксил-тРНК-синтетазы печени кроликов при экспериментальном инфаркте миокарда / Л. Ю. Лукошявичюс, Г. А. Родовичюс, М. И. Коваленко и др. // *Вопр. мед. химии.*—1983.—**29**, № 4.—С. 65—69.
14. Изучение молекулярных основ нарушения биосинтеза белка при экспериментальном инфаркте миокарда и аутолизе миокарда / М. И. Коваленко, Г. А. Родовичюс, А. П. Тамулявичюс и др. // *Молекуляр. биология.*—1984.—Вып. 37.—С. 18—21.
15. Аминоксил-тРНК-синтетазы и их высокомолекулярные комплексы при экспериментальной ишемии миокарда / Л. Л. Иванов, А.-А. И. Тамулявичюс, Л. Ю. Лукошявичюс и др. // *Молекуляр. биология.*—1984.—**18**, № 5.—С. 1326—1329.
16. Mitochondrial functions in ischemic myocardium / A. Toleikis, P. Džeja, A. Praškevičius, A. Jasaitis // *Mol. and Cell. Cardiol.*—1979.—**11**, N 1.—P. 55—76.
17. Pendergast A. M., Venema R. C., Traugh J. A. Regulation of phosphorylation of aminoacyl-tRNA synthetases in the high molecular weight core complex in reticulocytes // *J. Biol. Chem.*—1987.—**262**, N 13.—P. 5939—5942.

ЦНИЛ при Каунас. мед. ин-те

Получено 18.11.87

DISTRIBUTION OF LEUCYL-tRNA SYNTHETASE ACTIVITY IN POSTRIBOSOMAL EXTRACTS FROM THE RABBIT LIVER AND PIG MYOCARDIUM

L. L. Ivanov, Z. P. Martinkus, R. R. Stapulionis, L. J. Lukoševičius, A. V. Liekis

Central Research Laboratory of the Medical Institute, Kaunas

Summary

The distribution of leucyl-tRNA synthetase activity in postribosomal extracts from the rabbit liver and pig myocardium has been investigated both in norm and on the model of protein biosynthesis damage, i. e. myocardial ischemia. Gel chromatography of the postribosomal extracts on Sepharose 6B shows that leucyl-tRNA synthetase activity is distributed among the fractions with molecular weight of $1.82 \cdot 10^6$ or $0.84 \cdot 10^6$ (for the rabbit liver) and $0.97 \cdot 10^6$ or $0.132 \cdot 10^6$ (for pig myocardium). In the case of myocardial ischemia partial redistribution of leucyl-tRNA synthetase activity between the fractions with different molecular mass is observed in both extracts studied. It is supposed that association-dissociation processes of aminoacyl-tRNA synthetases may participate in regulation of the protein biosynthesis rate in the eukaryotic cells.