

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ ИЗ МИОКАРДА КРОЛИКА ПРИ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Р. К. Масколюнас, А. В. Лекис, М. И. Коваленко

Согласно ранее полученным данным [1—3], при ишемии происходят глубокие изменения в трансляционном аппарате клеток миокарда. Удобными моделями для исследования причин нарушения биосинтеза белка в клетке являются бесклеточные белоксинтезирующие системы. С их помощью можно в определенной мере выяснить вклад от-

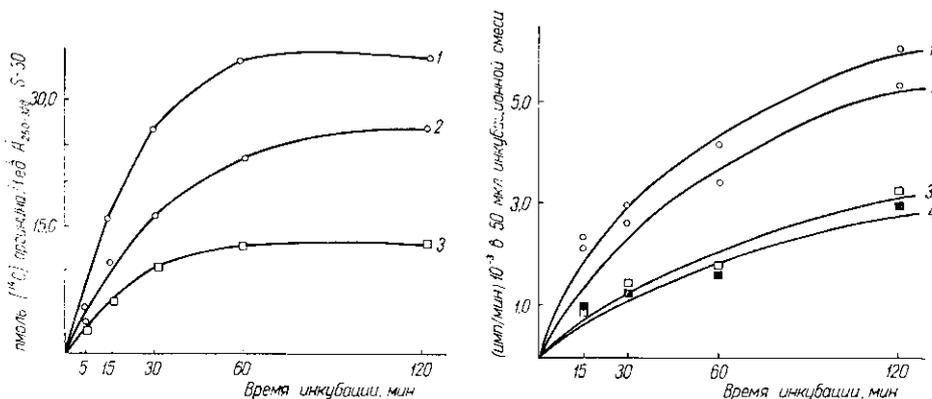


Рис. 1. Уровень включения ^{14}C -аргинина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе, содержащей неочищенную S-30 фракцию из миокарда: 1 — норма; 2 — 15 и 3 — 30-минутный аутолиз

Fig. 1. ^{14}C -arginine incorporation into TCA-insoluble product of translation in a «crude S-30 extract» cell-free system from the rabbit heart: 1 — intact myocardium; 2—15 min and 3—30 min autolyzed myocardium

Рис. 2. Уровень включения ^{14}C -лейцина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции в реконструированной бесклеточной белоксинтезирующей системе миокарда: 1 — рибосомы из интактного миокарда + цитозол из интактного миокарда; 2 — рибосомы из интактного миокарда + цитозол из ишемизированного миокарда; 3 — рибосомы из ишемизированного миокарда + цитозол из интактного миокарда; 4 — рибосомы из ишемизированного миокарда + цитозол из ишемизированного миокарда. Содержание рибосом и цитозола в исследованных системах было одинаковым

Fig. 2. ^{14}C -leucine incorporation into TCA-insoluble product of translation in reconstructed cell-free protein-synthesizing system from the rabbit heart: 1 — ribosomes from intact myocardium + cytosol from intact myocardium; 2 — ribosomes from intact myocardium + cytosol from ischemic myocardium; 3 — ribosomes from ischemic myocardium + cytosol from intact myocardium; 4 — ribosomes from ischemic myocardium + cytosol from ischemic myocardium. The ribosomes and cytosol concentrations were the same in all systems

дельных компонентов аппарата трансляции в общий уровень биосинтеза белка. В настоящей работе с помощью различных видов бесклеточных белоксинтезирующих систем изучены скорость и уровень биосинтеза белка в миокарде при тотальной ишемии.

Исследования проведены на кроликах-самцах весом 2,5—3,5 кг. Моделью тотальной ишемии служил аутолиз изолированного сердца согласно методу [4]. Продолжительность аутолиза составляло 15 и 30 мин, что соответствует времени обратимых и необратимых изменений в миокарде при данной патологии [5, 6]. Для изучения скорости и уровня биосинтеза белка были использованы бесклеточные белоксинтезирующие системы двух видов. Первой была неочищенная фракция S-30, которую получали по [7] с незначительными модификациями. Вторая система, включающая рибосомы и постмикросомальный супернатант — цитозол, — была получена согласно модифицированной методике [8]. О скорости и уровне биосинтеза белка в случае исследования неочищенной фракции S-30 судили по включению меченой аминокислоты в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции после 15 и 60 мин инкубации соответственно, в случае реконструированной системы проводили 15- и 120-минутную инкубацию соответствен-

но. Радиоактивность проб определяли, как описано ранее [7]. Время синтеза «средней» полипептидной цепи определяли по методу [9]. Результаты обрабатывали статистически с использованным *t*-критерия Стьюдента в доверительном интервале 0,05.

Результаты изучения скорости и уровня биосинтеза белка в бесклеточной белок-синтезирующей системе, содержащей неочищенную фракцию S-30, представлены на рис. 1. Согласно этим данным, уже при кратковременной ишемии миокарда (15-минутный аутолиз) скорость и уровень включения метки в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции снижается на 38 и 33 % соответственно. При увеличении времени аутолиза до 30 мин эти показатели уменьшаются на 63 и 65 % соответственно по сравнению с нормой.

Следует отметить, что обнаруженные изменения не обусловлены различием в содержании АТФ, ГТР, креатинфосфата, креатинфосфокиназы, так как их концентрация в инкубационной смеси, соответствующей норме и патологии, была приближена к оптимальной дополнительным внесением необходимых ингредиентов. На основании полученных результатов можно заключить, что тотальная ишемия сердца сопровождается снижением биосинтеза белка в клетках миокарда, не связанным только с нарушением энергетического баланса.

В дальнейших исследованиях был изучен один из кинетических показателей процесса трансляции — время синтеза «средней» полипептидной цепи. Определение данного параметра показало значительное увеличение его при патологии — от $1,61 \pm 0,12$ мин в норме до $3,46 \pm 0,54$ и $4,06 \pm 0,64$ мин — при 15- и 30-минутном аутолизе соответственно. Эти данные свидетельствуют о существенном снижении скорости биосинтеза белка в миокарде при ишемии, причем, скорее всего, на этапе элонгации полипептидной цепи. Последующие исследования были направлены на выяснение вопроса, какие факторы в наибольшей степени обуславливают обнаруженные изменения биосинтеза белка. Для этой цели была использована реконструированная бесклеточная система белкового синтеза, позволяющая разделять функциональную активность рибосом и цитозола путем создания «перекрестных» систем. Как видно из рис. 2, в обеих системах, содержащих рибосомальную фракцию из интактного миокарда, скорость и общий уровень биосинтеза белка гораздо выше, чем в системах из аутолизированной ткани. При этом вклад цитозольной фракции в разницу уровней биосинтеза белка в исследованных системах незначителен.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что одна из причин снижения скорости и уровня синтеза суммарных белков миокарда при ишемии связана с функционированием рибосом. Дальнейшие исследования направлены на выяснение вопроса — изменяется ли соотношение полисомы / моносомы в ишемизированном миокарде либо снижается интенсивность работы единицы трансляции.

PROTEIN BIOSYNTHESIS IN THE CELL-FREE PROTEIN-SYNTHESIZING SYSTEMS FROM RABBIT MYOCARDIUM DURING TOTAL ISCHEMIA

R. K. Maskoliunas, A. V. Liekis, M. I. Kovalenko

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev;
Medical Institute, Kaunas

Summary

A decrease of the total protein synthesis in various cell-free systems and a marked increase in the time of «average» polypeptide chain synthesis are found in the case of reversible and irreversible ischemic damage of the rabbit myocardium. One of the reasons of myocardium protein synthesis decay is established to be functional changes in ribosomes during ischemia.

1. *Иргашев Ш. Б.* Особенности синтеза белка в сердце и печени при экспериментальном инфаркте миокарда // Актуал. вопр. кардиологии.— Ташкент: Изд-во Ташкент. мед. ин-та, 1980.— С. 34—35.
2. *Аминоацил-тРНК синтетазы и их высокомолекулярные комплексы при экспериментальной ишемии миокарда / Л. Л. Иванов, А. У. Тамулявичюс, Л. Ю. Лукошявичюс и др. // Молекуляр. биология.— 1984.—18, № 5.— С. 1326—1329.*
3. *Изучение молекулярных основ нарушения биосинтеза белка при экспериментальном инфаркте миокарда и аутолизе миокарда / М. И. Коваленко, Г. А. Родовичюс, А. У. Тамулявичюс и др. // Молекуляр. биология.— 1984.— Вып. 37.— С. 18—21.*

4. *Morphologic and biochemical changes in autolyzing dog heart muscle* / L. C. Armiger, R. N. Seelye, V. M. Carnell et al. // *Lab. Invest.*—1976.—34, N 4.—P. 357—362.
5. *Changes in ultrastructure and Ca²⁺ distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia* / M. Borghers, L. G. Shu, R. Xhonneux et al. // *Amer. J. Pathol.*—1987.—126, N 1.—P. 92—102.
6. *Jennings R. B., Ganole C. E. Structural changes in myocardium during acute ischemia* // *Circ. Res.*—1974.—34, Suppl. 1.—P. 156—172.
7. *Изучение молекулярных механизмов гипоальбуминемии на модели экспериментального инфаркта миокарда* / А. В. Лекис, Л. Ю. Лукошьявичюс, М. И. Коваленко, О. В. Булдакова // *Биополимеры и клетка.*—1985.—1, № 6.—С. 322—327.
8. *Явич М. П., Лерман М. И. Бесклеточная система белкового синтеза из сердечной мышцы кролика* // *Вопр. мед. химии.*—1976.—№ 3.—С. 307—311.
9. *Лейтин В. Л., Лерман М. И. Методы определения времени синтеза средней полипептидной цепи* // *Соврем. методы в биохимии.*—М.: Медицина, 1977.—С. 277—285.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Каунас. мед. ин-т МЗ ЛитССР

Получено 23.03.88

УДК 577.213:579.852.11

НЕКОТОРЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ *VamHI*- И *VnaI* -РЕСТРИКТАЗАМИ С ОДИНАКОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Э. Л. Ким, О. П. Махович, С. С. Малюта

Введение В настоящее время список обнаруженных эндонуклеаз рестрикции II класса насчитывает более 500 наименований, из которых прототипами, т. е. рестриктазами с уже определенной специфичностью, является только 1/5 часть. Остальные представляют собой изоизомеры уже известных эндонуклеаз [1]. Явление изоизомерии известно давно, с начала поиска рестриктаз у разных микроорганизмов, ведущегося активно до настоящего времени, и представляет большой интерес. Однако вследствие того, что изучение рестриктаз часто ограничивается лишь определением специфичности этих ферментов, явление рестрикции-модификации вообще и изоизомерии в частности остается малоизученным до сих пор.

Для эндонуклеазы *VamHI*, обнаруженной в клетках *Bacillus amyloliquefaciens* в 1975 году [2], в настоящее время известно 14 изоизомеров, одним из которых является *VnaI*, обнаруженный нами в штамме *Bac. natto* B3364 [3]. Оба фермента специфически расщепляют последовательность GGATCC между гуаниновыми остатками.

Ввиду вышесказанного для нас представляло интерес сравнительное исследование некоторых физико-химических свойств двух изоизомеров — рестриктаз *VamHI* и *VnaI*.

Материалы и методы. В работе использовали бактериальные штаммы из музея отдела генетической инженерии Ин-та молекуляр. биологии и генетики АН УССР; ДНК фага λ, эндонуклеаза *VamHI* (НПО «Фермент», Вильнюс); лизоцим («Ampersham», Англия); эндонуклеаза *VamHI* («Pharmacia», Швеция); ДЭАЭ-целлюлоза («Whatman», Англия), бромистый этидий, агароза («Sigma», США); акриламид, метиленабисакриламид («Bio-Rad», США).

Клетки штаммов *Bac. natto* или *Bac. amyloliquefaciens* выращивали на аминокислотной среде до середины логарифмической фазы роста. Для получения бесклеточного экстракта клетки суспендировали в буфере А (20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ЭДТА, 2 мМ 2-меркаптоэтанол), содержащем лизоцим в концентрации 1 мг/мл, инкубировали в течение 20 мин при 0°C и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора в режиме 6—12 Гц 10 раз по 30 с с перерывами по 1 мин между озвучиваниями. Клеточную суспензию центрифугировали при 48000 g в течение 60 мин. Полученный бесклеточный экстракт наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1×45 см) со скоростью 0,5 мл/мин. После отмывки колонки до нулевой оптической плотности связавшийся материал элюировали 1 л градиента NaCl (0—0,05 M) в буфере А. Фракции, содержащие активность *VnaI* или *VamHI*, высаливали 65% насыщения сернистого аммония. Суспензию хранили при -5°C в течение месяца без потери активности.

Электрофорез белков в денатурирующем 12,5%-ном и градиентном 5—25%-ном нативном полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу [4]. Элюцию белков из нативного ПААГ после электрофореза осуществляли методом замораживания в жидком азоте и последующим размораживанием нарезанных участков геля, измельченных в буфере А. Элюат, содержащий *VnaI*-активность, анализировали методом элект-