

А. П. Кашаускас, Л. Л. Иванов,
Л. Ю. Лукошявичюс, Г. А. Родовичюс, Д. З. Кондротас

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ ИЗ МИОКАРДА СВИНЬИ ПРИ АНОКСИИ

Изучено влияние аноксии на биосинтез белка в бесклеточной системе из миокарда свиньи. Установлено, что скорость и уровень включения [¹⁴C]лейцина в продукт трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе, полученной из миокарда свиньи после аноксии, ниже, чем в системе из контрольного миокарда. Авторадиография электрофореграммы радиоактивных белков, синтезированных в бесклеточной системе, свидетельствует о резком снижении после 90-мин аноксии миокарда уровня включения радиоактивных аминокислот в суммарный продукт трансляции. Спектр синтезируемых белков при этом практически не меняется. Показано, что снижение биосинтеза белка после 20-мин аноксии связано с изменениями в цитозоле, а после 90-мин — как с изменениями в цитозоле, так и с нарушением функционирования рибосомной фракции.

Введение. Несмотря на важность биосинтеза белка для нормального функционирования органов, многие аспекты его регуляции, а также вопросы стабильности функционирования аппарата трансляции в экстремальных условиях далеки от окончательного решения. Один из известных факторов, вызывающих нарушение метаболических процессов в клетках, в том числе и биосинтеза белка, является недостаточность обеспечения тканей кислородом (аноксия) [1]. В литературе встречаются единичные сведения о том, что нарушение биосинтеза белка при аноксии связано как со снижением обеспечения клеток макроэргическими соединениями [2], так и с изменениями в самом аппарате трансляции [3]. Ранее мы обнаружили, что аноксия миокарда свиньи сопровождается изменением активности тРНК и аминоацил-тРНК синтетаз [4].

В данной работе проведено изучение скорости и уровня биосинтеза белка в бесклеточных системах, полученных из миокарда свиньи после кратковременной (20 мин) и продолжительной (90 мин) аноксии.

Материалы и методы. В работе использовали сердца свиней массой 100—150 г. Условия препарирования и перфузии изолированных сердец, а также воспроизведения аноксии миокарда описаны ранее [4]. Контролем служили сердца, перфузированные в аэробных условиях.

Препараты полирибосом выделяли из миокарда свиньи по методу Ветштейна и др. [5]. Цитозолем являлась фракция пострибосомного супернатанта, освобожденная от эндогенных низкомолекулярных примесей с помощью хроматографии на сефадексе G-15.

Бесклеточная белоксинтезирующая система в объеме 100 мкл содержала: 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 5 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0,25 мМ АТР, 0,25 мМ GTP, 3 мкг креатинфосфокиназы, 10 мМ креатинфосфат, 0,025 мМ каждую из нерадиоактивных аминокислот (кроме лейцина), 0,025 мМ [¹⁴C]лейцин, 0,25 о. е. (A_{260–320}) цитозоля и 0,25 о. е. (A_{260–320}) рибосом. Время инкубации реакционной смеси составляло 15 мин (для определения скорости биосинтеза белка) и 60 мин (для определения уровня биосинтеза белка) при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,1 М КОН, пробы инкубировали 20 мин (для гидролиза аминоацил-тРНК) и осаждали 10 %-й трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Осадки собирали на нитроцеллюлозных фильтрах и промывали 5 %-й ТХУ. Радиоактивность определяли в толуоловом сцинтилляторе на счетчике «Delta 300» (Голландия). О скорости и уровне биосинтеза белка в бесклеточной системе судили по включению [¹⁴C]лейцина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции эндогенных мРНК.

Электрофорез в полиакриламидном геле (13 %) в присутствии DS-Na проводили по методу Лэммли [6]. Для выявления продуктов трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе использовали метод авторадиографии. Окрашенные гели обрабатывали препаратом

© А. П. Кашаускас, Л. Л. Иванов, Л. Ю. Лукошявичюс, Г. А. Родовичюс, Д. З. Кондротас, 1992.

Amplify («Amersham», США) в течение 1 ч, высушивали и экспонировали с пленкой РМ-В при температуре -80°C 8 дней, после чего пленку проявляли.

Результаты и обсуждение. В таблице представлены результаты определения скорости и уровня биосинтеза белка в бесклеточной белоксинтезирующей системе, свидетельствующие о снижении включения $[^{14}\text{C}]$ лейцина в продукт трансляции бесклеточной системы, полученной

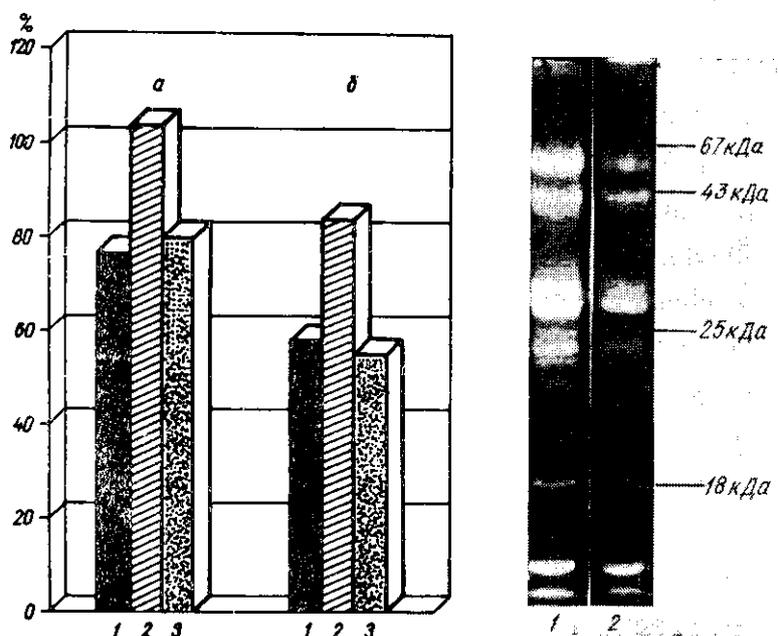


Рис. 1. Уровень включения $[^{14}\text{C}]$ лейцина в продукт трансляции в бесклеточных белоксинтезирующих системах из миокарда свиньи. За 100 % принят уровень биосинтеза белка в бесклеточной системе из контрольного миокарда: 1 — рибосомы (контроль) + цитозоль (аноксия); 2 — рибосомы (аноксия) + цитозоль (контроль); 3 — рибосомы (аноксия) + цитозоль (аноксия); а — 20-мин аноксия; б — 90-мин аноксия

Рис. 2. Радиоавтография электрофореграммы радиоактивных белков, синтезированных в бесклеточной системе из контрольного миокарда свиньи (1) и после 90-мин аноксии (2). Стрелками обозначены маркерные белки: бычий сывороточный альбумин (67 000), овальбумин (43 000), химотрипсиноген (25 000), миоглобин (18 000)

из миокарда свиньи при аноксии. Реоксигенация аноксического миокарда приводит к восстановлению как скорости, так и уровня биосинтеза белка практически до контрольных значений. Результаты проведенных исследований наряду с данными других авторов [7] указывают на возможность восстановления метаболических процессов в миокарде после кратковременной аноксии сердца.

Для выяснения вопроса, какой из компонентов белоксинтезирующей системы ответствен за снижение уровня биосинтеза белка при аноксии, была использована гетерологическая бесклеточная система, позволяющая в отдельности исследовать функциональную активность рибосом и цитозоля миокарда в процессе трансляции. Согласно данным, приведенным на рис. 1, а, в системе, содержащей цитозоль из контрольного, а рибосомы — из аноксического миокарда, включение $[^{14}\text{C}]$ лейцина в продукт трансляции не отличается от контрольного уровня. В системе, содержащей цитозоль из аноксического, а рибосомы — из контрольного миокарда, уровень включения лейцина на 23 % ниже, чем в контроле. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение уровня включения лейцина в продукт трансляции при 20-мин аноксии связано с изменениями в цитозоле. Рибосомная фракция при этом не оказывает заметного влияния на уровень биосинтеза белка в исследованной системе. Снижение уровня биосинтеза белка в бесклеточной системе, полученной из миокарда свиньи после 90-мин аноксии (рис. 1, б), обусловлено как

изменением активности компонентов цитозоля, так и нарушении функционирования рибосом, однако влияние цитозоля более выражено.

Есть сведения о том, что при нарушении функционирования сердечной мышцы изменяется спектр синтезируемых белков [8]. Например, показано, что в миокарде при ишемии индуцируется синтез стрессового белка *SP71* [9], а также пептида, ингибирующего процесс трансляции [10]. Поэтому в последующих экспериментах анализировали продукты трансляции в бесклеточных белоксинтезирующих системах, содержащих рибосомную фракцию и цитозоль из контрольного миокарда свиньи, а также после 90-мин аноксии. Электрофорез продуктов трансляции с последующей автордиографией не выявил каких-либо изменений в спектре синтезируемых при аноксии белков (рис. 2). Однако интенсивность включения радиоактивных аминокислот в суммарный продукт трансляции в случае аноксии резко снижена.

Включение [¹⁴C] лейцина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе из миокарда свиньи (пмоль на 1 о. с. A₂₆₀₋₃₂₀ рибосомной фракции: M±m; n=6)

Источник рибосом и цитозоля	Время инкубации, мин	
	15	60
Контроль	13,1±0,5	20,9±0,7
Аноксия (20 мин)	9,1±0,3	14,8±0,5
Аноксия (20 мин) + реоксигенация (20 мин)	11,6±0,4*	19,7±0,5*

* Изменения по сравнению с контролем статистически достоверны.

Таким образом, при аноксии в миокарде имеет место снижение скорости и уровня биосинтеза белка, которое, в первую очередь, определяется изменениями в цитозоле клеток. Одной из причин этого явления может быть изменение при аноксии активности тРНК и аминоацил-тРНК синтетаз [4], являющихся компонентами цитозоля. Вместе с тем снижение уровня биосинтеза белка в миокарде при продолжительной аноксии связано также с изменениями в рибосомной фракции. Возможно, это обусловлено перераспределением рибосомного материала между классами свободных и мембраносвязанных рибосом, как это было отмечено для миокарда кролика при тотальной ишемии [11]. Изучение этого вопроса является предметом наших дальнейших исследований.

Summary. Influence of anoxia on protein biosynthesis in cell-free system from pig myocardium was studied. The rate and level of [¹⁴C]-leucine incorporation into translational product were lower in cell-free system obtained from pig myocardium after anoxia than in system from control myocardium. Fluorography of electrophoregram of radioactive proteins synthesized in cell-free system has revealed a sharp decrease in the level of radioactive amino acids incorporation into total translational product 90 min after anoxia. The spectrum of proteins synthesized under these conditions did not change. The decrease in protein biosynthesis 20 min after anoxia is shown to depend on the alterations in cytosol, whereas 90 min after anoxia this phenomenon is related also to the changes in the ribosomal fraction.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jefferson L. S., Wolpert E. B., Giger K. E., Morgan H. E. Regulation of protein synthesis in heart muscle. Effects of anoxia on protein synthesis // *J. Biol. Chem.*— 1971.— 246, N 8.— P. 2171—2178.
2. Cobbe S. M., Poole-Wilson P. A. Tissue acidosis in myocardial hypoxia // *J. Mol. and Cell. Cardiol.*— 1980.— 12, N 8.— P. 761—770.
3. McLennon P., Rennie M. J. Effect of ischemia, blood less and reperfusion on rat muscle protein synthesis, metabolite concentrations and polyribosome profiles *in vivo* // *Biochem. J.*— 1989.— 260, N 2.— P. 195—200.
4. Кашаевас А. П., Тамулявичюс А.-А. В., Лукошявичюс Л. Ю. и др. Биологическая активность тРНК и аминоацил-тРНК синтетаз миокарда свиньи при аноксии и последующей реоксигенации // *Вопр. мед. химии.*— 1988.— 34, № 2.— С. 84—86.

5. *Wettstein F. D., Staechelin T., Noll H.* Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis characterization of the ergosomes // *Nature*.—1963.—197, N 4866.—P. 430—437.
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. *Schreiber S. S., Oratz M., Rothschild M. A.* Post ischemic reperfusion and anoxic perfusion in the isolated heart: alteration in distribution of radionuclides and in protein synthesis // *J. Physiol.*—1980.—76, N 7.—P. 777—784.
8. *White F. P., White S. R.* Isoproterenol induced myocardial necrosis is associated with stress protein synthesis in rat heart and thoracic aorta // *Cardiovasc. Res.*—1986.—20, N 7.—P. 512—515.
9. *Currie R. W.* Effect of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts // *J. Mol. and Cell. Cardiol.*—1987.—18, N 8.—P. 795—808.
10. *Havre P. A., Hammond G. L.* Isolation of a translation-inhibiting peptide from myocardium // *Amer. J. Physiol.*—1988.—255, N 5.—P. H1024—H1031.
11. *Prashkevichius A., Maskoliunas R., Stapulionis R. et al.* Protein biosynthesis machinery under myocardial ischemia // *Exp. Biol.*—1990.—N 1.—P. 47—55.

Каунас. мед. академия, Литовская Республика

Получено 05.05.92

УДК 577.112.5

Э. А. Козлов, Л. В. Гудкова, Т. Л. Левитина,
М. Т. Кириленко, О. С. Мирошниченко

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРИПТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ КАТАЛАЗЫ ГРИБА PENICILLIUM VITALE

Дополнительно к ранее опубликованным пептидам из триптического гидролизата каталазы гриба *P. vitale* выделено 26 пептидов, включающих 364 остатка аминокислот. Установлено их полное или частичное строение. Всего из каталазы выделено 68 пептидов, насчитывающих в сумме 630 остатков. 65 пептидов имеют уникальные последовательности и включают 595 остатков (86% полипептидной цепи белка).

Введение. Ранее [1, 2] нами был выделен ряд пептидов из триптического гидролизата каталазы гриба *P. vitale* и установлено полное или частичное строение 43 пептидов [3], насчитывающих в сумме 305 остатков аминокислот. Мы продолжили работу по выделению и изуче-

Таблица 1

Аминокислотный состав триптических пептидов каталазы

Аминокислота	T 1	T 2	T 4	T 5	T 6	T 11	T 16	T 17	T 22	T 23	T 29	T 36
Lys	0,8(1)	1,0(1)	2,0(2)	—	1,0(1)	—	2,0(2)	—	1,0(1)	1,0(1)	—	—
His	—	0,7(1)	1,2(2)	0,8(1)	—	—	—	—	—	—	—	—
Arg	—	—	—	2,0(2)	—	1,0(1)	—	1,0(1)	—	—	1,0(1)	2,0(2)
Asp	4,9(5)	2,1(1)	2,7(3)	1,9(2)	2,1(2)	0,9(1)	—	—	1,0(1)	1,8(2)	1,0(1)	0,8(1)
Thr	0,9(1)	2,7(3)	2,5(3)	—	0,9(1)	—	1,8(2)	—	0,9(1)	—	—	3,0(3)
Ser	1,6(2)	3,4(4)	2,3(3)	—	0,7(1)	3,3(4)	0,7(1)	0,8(1)	0,7(1)	0,8(1)	—	1,5(2)
Glu	3,2(3)	1,9(2)	3,2(3)	2,1(2)	4,1(4)	2,9(3)	1,1(1)	—	1,2(1)	—	1,0(1)	2,1(2)
Pro	—	—	2,6(3)	3,0(3)	2,1(2)	—	1,0(1)	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Gly	2,6(3)	3,8(4)	3,1(3)	2,2(2)	3,2(3)	1,7(2)	—	2,1(2)	—	1,2(1)	—	1,1(1)
Ala	5,1(5)	4,1(4)	4,2(4)	—	3,1(3)	1,1(1)	—	2,0(2)	—	—	—	1,2(1)
1/2 Cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Val	2,5(3)	—	1,5(2)	—	1,0(1)	—	—	—	1,0(1)	—	—	0,5(1)
Met	0,8(1)	—	—	—	0,8(1)	—	—	—	—	—	—	1,2(2)
Ile	—	—	1,7(2)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	—	—	—	—	—	—
Leu	1,1(1)	3,1(3)	—	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	—	1,0(1)	—	—	1,0(1)	0,5(1)
Tyr	0,9(1)	0,8(1)	0,6(1)	—	—	—	—	0,8(1)	—	—	—	—
Phe	1,7(2)	1,8(2)	2,0(2)	1,1(1)	1,9(2)	—	0,9(1)	—	0,7(1)	—	—	1,6(2)
Trp	—	+(1)	—	—	-(1)	—	—	—	—	—	—	—
Всего	28	28	33	15	24	14	8	9	8	6	5	19