

Р. К. Масколюнас

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ТРАНСЛЯЦИИ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ ИЗ МИОКАРДА КРОЛИКА В НОРМЕ И ПРИ ИШЕМИИ

Проведено сравнение скорости включения радиоактивных аминокислот в продукт трансляции в реконструированных бесклеточных системах, включающих цитозол и полисомы из нормального и ишемизированного миокарда. Показано, что изменение белоксинтезирующей активности зависит главным образом от препаратов рибосом. Электрофоретический анализ продуктов трансляции с последующей автордиографией продемонстрировал некоторое перераспределение белковых фракций в системе из ишемизированного миокарда.

Известно, что при ишемии сердечной мышцы происходят значительные структурно-функциональные изменения основных компонентов трансляционного аппарата [1, 2], приводящие к нарушению метаболических процессов в клетке [3]. В предыдущих работах [4, 5] с помощью бесклеточных белоксинтезирующих систем из миокарда кролика были изучены скорость и уровень биосинтеза белка в сердце в норме и при данной патологии, а также охарактеризован пул рибосом. Нами было обнаружено, что при тотальной ишемии происходит ярко выраженное перераспределение между классами свободных от мембран и мембраносвязанных рибосом, уменьшается доля полисом в препаратах суммарных и свободных рибосом.

Пытаясь выяснить биологический смысл такого перераспределения, в настоящей работе изучали функциональную активность разных классов рибосом, а также провели электрофоретический анализ продуктов трансляции эндогенных мРНК в бесклеточных белоксинтезирующих системах, полученных из нормальной и ишемизированной сердечной мышцы.

Исследования проведены на кроликах-самцах весом 2,5—3,5 кг. Моделью тотальной ишемии служил аутолиз изолированного сердца согласно методу [6]. Продолжительность аутолиза составляла 30 мин. Для изучения активности препаратов рибосом была использована реконструированная бесклеточная белоксинтезирующая система, включающая цитозол и рибосомы. Цитозол, препараты суммарных, свободных от мембран и мембраносвязанных рибосом выделяли, как описано в [7, 8] с некоторыми модификациями. Об интенсивности полипептидного синтеза судили по включению меченой аминокислоты в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции после 15-минутной инкубации, радиоактивность проб определяли согласно [9].

Электрофорез белков в 13 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na проводили по методу Лэммли [10] с небольшими

Включение ^{14}C -лейцина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции в системе, реконструированной из цитозола и рибосом разных классов (в пмолях на 1 мг рибосом) в норме и при 30-минутном аутолизе ($M \pm m$)

^{14}C -leucine incorporation into TCA-insoluble product of translation in reconstructed cell-free system consisting of cytosol and various classes of ribosomes (pmol/mg of ribosomes) in norm and after 30 min autolysis ($M \pm m$)

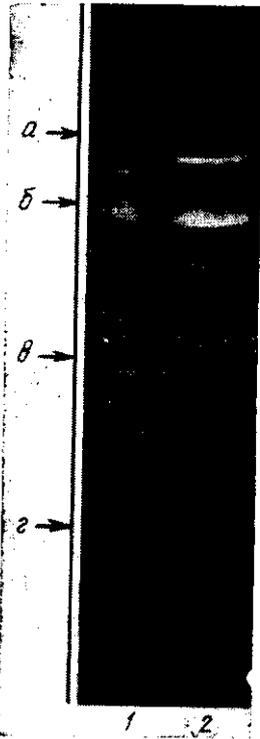
| Класс рибосом | $P_n + C_n$ | $P_{in} + C_{in}$ | $P_n^* + C_n^*$ | $P_{in}^* + C_{in}^*$ |
|-------------------|--------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Свободные | 509,6 ± 17,6 | 453,6 ± 12,0 | 372,8 ± 9,6 | 316,0 ± 8,8 |
| Мембраносвязанные | 44,0 ± 11,8* | 24,4 ± 12,3* | 123,2 ± 19,2 | 75,2 ± 15,2* |

Примечание. P_n и P_{in} — рибосомы из интактного и ишемизированного миокарда соответственно; C_n и C_{in} — цитозол из интактного и ишемизированного миокарда соответственно. Время инкубации 15 мин.

* Изменения статистически недостоверны.

модификациями. Гели после электрофореза обрабатывали препаратом Amplify («Amersham», США) в течение 1 ч, высушивали и экспонировали с пленкой РМ-В при температуре -80°C .

Результаты экспериментов, проведенных с использованием гомогенной бесклеточной белоксинтезирующей системы, состоящей из цитозола и рибосомных препаратов, показали существенное изменение скорости включения метки в продукт трансляции при данной патологии (таблица). Использование же перекрестных систем позволило оценить



влияние ишемии на рибосомные препараты и цитозол в отдельности. Оказалось, что отмеченные изменения зависят, главным образом, от препаратов рибосом, так как активность свободных рибосом уменьшается на 28%, а активность мембраносвязанных — значительно увеличивается, в то время как белоксинтезирующая активность цитозола из ишемизированной ткани уменьшается в значительной степени.

Увеличение относительного содержания мембраносвязанных рибосом и их функциональной активности может быть связано с увеличе-

Радноавтограф электрофоретического разделения в 13%-ном ПААГ продуктов трансляции в реконструированной бесклеточной системе: 1 — белки, синтезированные в бесклеточной системе из интактного миокарда; 2 — то же из ишемизированного миокарда. Стрелками обозначены немеченные белки-маркеры: а — бычий сывороточный альбумин (67 000); б — яичный альбумин (43 000); в — химотрипсиноген (25 000); з — миоглобин (18 000)

Polyacrylamide gel (13%) electrophoresis of ^{14}C -labelled translation products in the reconstructed cell-free system. 1 — proteins synthesized in the cell-free system from intact myocardium; 2 — proteins synthesized in the cell-free system from ischemic myocardium. Arrows indicate nonradioactive molecular weight standards: a — bovine serum albumin (67 kD), б — ovalbumin (43 kD), в — chymotrypsinogen (25 kD), з — myoglobin (18 kD)

нием синтеза белков, предназначенных на экспорт (эластин, коллаген и др.). С другой стороны, присоединение рибосом к мембранам, возможно, стабилизирует полисомную структуру пула рибосом, что позволяет продолжать синтез белков, синтезирующихся свободными полисомами в нормальных условиях.

Электрофоретический анализ продуктов трансляции с последующей автораднографией показал некоторое перераспределение белковых фракций в системе из ишемизированного миокарда (рисунок, дорожка 2). Однако отличия не так велики, чтобы подтвердить первое предположение. Скорее всего, при данном патологическом состоянии могут реализоваться обе вышеуказанные возможности.

Идентификация полипептидов, появляющихся во время ишемии, позволила бы более углубленно исследовать механизм изменения белкового синтеза в условиях этой патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аминоацил-тРНК-синтетазы и их высокомолекулярные комплексы при экспериментальной ишемии миокарда / Л. Л. Иванов, А. И. Тамулявичюс, Л. Ю. Лукошявичюс и др. // Молекуляр. биология. — 1984. — № 5. — С. 1326—1329.
2. Изучение молекулярных основ нарушения биосинтеза белка при экспериментальном инфаркте миокарда и аутолизе миокарда / М. И. Коваленко, Г. А. Родовичюс, А. И. Тамулявичюс и др. // Молекуляр. биология. — 1984. — Вып. 37. — С. 18—21.
3. Reimer K. A., Ideker R. E. Myocardial ischemia and infarction: anatomic and biochemical substrates for ischemic cell death and ventricular arrhythmias // Hum. Pathol. — 1987. — 18, N 5. — P. 462—475.

4. Масколюнас Р. К., Лекис А. В., Коваленко М. И. Биосинтез белка в бесклеточных белоксинтезирующих системах из миокарда кролика при тотальной ишемии // Биополимеры и клетка.— 1989.—5, № 1.— С. 84—86.
5. Масколюнас Р. К. Структурно-функциональные изменения в пуле рибосом миокардиальных клеток кроликов при тотальной ишемии // Сб. науч. тр. 1-ой респ. конф. молодых ученых медиков ЛитССР.— Каунас, 1988.— С. 54—57.
6. Morphological and biochemical changes in autolyzing dog heart muscle / L. C. Armitage, R. N. Seelye, V. M. Carnell et al. // Lab. Invest.— 1976.—34, N 4.— P. 357—362.
7. Явич М. П., Лерман М. И. Бесклеточная система белкового синтеза из сердечной мышцы кролика // Вопр. мед. химии.— 1976.— № 3.— С. 307—327.
8. Берман А. Е. Метод выделения полирибосом, свободных и связанных с мембранами цитоплазматической сети // Современ. методы в биохимии.— М.: Медицина, 1977.— С. 300—303.
9. Изучение молекулярных механизмов гипоальбуминемии на модели экспериментального инфаркта миокарда / А. В. Лекис, Л. Ю. Лукошвичюс, М. И. Коваленко, О. В. Буддакова // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 6.— С. 322—327.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.—227, N 5259.— P. 680—685.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 20.03.89

ELECTROPHORETICAL ANALYSIS OF TRANSLATION PRODUCTS IN THE CELL-FREE SYSTEMS FROM NORMAL AND ISCHEMIC RABBIT MYOCARDIUM

R. K. Maskoliunas

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

Summary

The rate of radioactive amino acid incorporation into translational product in the reconstructed protein-synthesizing cell-free systems, consisting of cytosol and polyribosomes from normal and ischemic myocardium is compared. The alteration in protein-synthesizing activity is shown to depend mainly on the properties of polyribosomal preparations. Electrophoretical analysis of the translational products with subsequent fluorography has revealed redistribution of some protein fractions in the system from ischemic myocardium.

УДК 577.112.088.3

А. Д. Яремчук, М. А. Тукало, А. В. Коноваленко,
С. П. Егорова, Г. Х. Мацука

ВЫДЕЛЕНИЕ СЕРИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ THERMUS THERMOPHILUS HB-27

Описан метод выделения высокоочищенного препарата серил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus*. Использовали высаливание сульфатом аммония, хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе, оксианатите, генарин-сефарозе и гидрофобную хроматографию на поливинилолом сорбенте Toyopearl HW-65. Выход очищенного фермента составил 4 мг из 1 кг клеток *T. thermophilus*. Серил-тРНК синтетаза является димером α_2 -типа. Молекулярная масса фермента 90000.

Аминоацил-тРНК синтетазы и тРНК являются уникальными объектами для изучения молекулярных механизмов белково-нуклеинового взаимодействия. В настоящее время достигнуты определенные успехи в исследовании структуры тРНК — аминоацил-тРНК синтетазного комплекса [1]. Однако подобные работы проводились с тРНК первого класса, имеющими короткую переменную петлю. Экспериментальные же данные по изучению взаимодействия аминоацил-тРНК синтетаз с тРНК второго класса (с длинной переменной петлей) крайне ограничены.