

5. Laemmli U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—Р. 680—685.
6. Векшин Н. Л. Фотоконформационная релаксация белковой структуры по данным триптофановой флуоресценции // Биофизика.—1987.—32, № 4.—С. 588—591.
7. Векшин Н. Л. Фотоника биологических структур.—Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1988.—164 с.
8. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.—М.: Мир, 1986.—496 с.
9. Туроверов К. К., Кузнецова И. М., Зайцев В. Н. Интерпретация УФ-флуоресценции азурина на основе данных рентгеноструктурного анализа // Биоорг. химия.—1984.—69, № 6.—С. 792—806.

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

Получено 16.08.91

УДК 577.217:337.32

**Сана Сара, Л. Л. Иванов, Г. В. Турковская,
З. П. Мартинкус, М. И. Коваленко, А. В. Ельская**

ВЛИЯНИЕ РИБОСОМ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ

Проведено сравнительное изучение степени термостабильности свободных и ассоциированных с полирибосомами аминоксил-тРНК синтетаз печени кроликов. Показано, что ферменты, выделенные в ассоциированном с полирибосомами состоянии, более устойчивы к тепловой инактивации, чем в свободном. Установлено, что добавление как 80S рибосом, так и 40S и 60S субчастиц рибосом повышает термостабильность лейцил-тРНК синтетазы в составе высокомолекулярного комплекса печени кролика.

Введение. Отличительные особенности эукариотических аминоксил-тРНК синтетаз заключаются в их способности образовывать высокомолекулярные комплексы [1], связываться с высокомолекулярной РНК [2] и ассоциировать с рибосомами [3]. Предполагается [3, 4], что эти эволюционно приобретенные свойства необходимы аминоксил-тРНК синтетазам для их компартментализации в клетке в местах функционирования. Кроме того, показано, что в комплексе с рибосомами они характеризуются повышенной ферментативной активностью [5—7] и термоустойчивостью [8, 9]. Тем не менее вопрос о непосредственном механизме синтетазно-рибосомного взаимодействия остается открытым.

В данной работе проведено сравнительное изучение степени термостабильности четырех свободных и ассоциированных с полирибосомами аминоксил-тРНК синтетаз печени кроликов. Вместе с тем, изучено влияние 80S рибосом и 40S и 60S субчастиц рибосом на термостабильность лейцил-тРНК синтетазы в составе высокомолекулярного комплекса аминоксил-тРНК синтетаз, который, по данным Данга [1], в клетках млекопитающих связан с полирибосомами.

Материалы и методы. Получение полирибосом. Печень кроликов гомогенизировали в двух объемах 0,02 М трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 0,03 М КСl, 0,002 М MgCl₂, 0,25 М сахарозу, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид. Гомогенат центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин в роторе 6X × 25 мл на центрифуге К-25 (Германия) для удаления обрывков клеточек ядер и митохондрий. Надосадочную жидкость фильтровали через четыре слоя стерильной марли, в течение 20 мин обрабатывали раствором, содержащим тритон X-100 (конечная концентрация 2 %) и дезоксихолат натрия (1,3 %), наслаивали на 1 М сахарозу и центрифугировали при 47 000 об/мин в течение 2 ч в роторе Т-50 на центрифуге УЦП-65. Полученные осадки полирибосом суспендировали в буфере для гомогенизации, осветляли центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин. Аминоксил-тРНК синтетазы отделяли от рибосом промыванием 0,05 М трис-НСl буфером (рН 7,5), содержащим 0,5 М КСl, 0,01 М MgCl₂, 0,25 М сахарозу, в течение 20 мин при 4 °С с последующим центрифугированием при 105 000 g в течение 90 мин.

© САНА САРА, Л. Л. ИВАНОВ, Г. В. ТУРКОВСКАЯ, З. П. МАРТИНКУС, М. И. КОВАЛЕНКО, А. В. ЕЛЬСКАЯ, 1992

Выделение 40S и 60S субчастиц рибосом детально описано в работе [10]. Рибосомные белки из 40S и 60S субчастиц рибосом экстрагировали, как описано [11]. рРНК выделяли из печени кроликов по методике, предложенной в работе [12].

Выделение комплекса аминоксил-тРНК синтетаз. Высокомолекулярный комплекс аминоксил-тРНК синтетаз выделяли из печени кролика мягкой гомогенизацией ткани с последующей хроматографией безрибосомной надосадочной фракции на сефадексе G-200 [13].

Активность аминоксил-тРНК синтетаз определяли по начальной скорости реакции аминоксилации тРНК при насыщающих концентрациях субстратов. Состав реакционной смеси описан в работе [14].

Термоинактивацию аминоксил-тРНК синтетаз изучали при 42 °С. Константы скорости термоинактивации определяли по методике, описанной в работе [15]. Рибосомы и рибосомные субчастицы для изучения влияния на термостабильность лейцил-тРНК синтетазы вносили в реакционную смесь в концентрации 0,7 мкМ.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены результаты определения степени термоинактивации четырех аминоксил-тРНК синтетаз. Данные таблицы свидетельствуют о том, что указанные аминоксил-тРНК синтетазы, выделенные в ассоциированном с полирибосомами состоянии, более устойчивы к тепловой инактивации, чем свободные.

Какие же компоненты рибосом ответственны за повышение устойчивости аминоксил-тРНК синтетаз к температурному воздействию? Для ответа на этот вопрос нами было изучено влияние 40S и 60S субчастиц рибосом, а также 80S рибосом на термостабильность лейцил-тРНК синтетазы, являющейся компонентом высокомолекулярного комплекса, аминоксил-тРНК синтетаз печени кролика [13]. Данные, приведенные на рисунке, свидетельствуют о том, что добавление 80S рибосом, 40S и 60S субчастиц рибосом повышает термостабильность лейцил-тРНК синтетазы примерно в равной степени. Для проверки специфичности стабилизирующего действия рибосом и их субчастиц на лейцил-тРНК синтетазу была изучена термоинактивация этого фермента в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА), рРНК, а также смеси экстрагированных рибосомных белков. Как оказалось (табл. 2), БСА оказывает слабое протекторное воздействие на лейцил-тРНК синтетазу печени кролика, а рРНК практически не влияет на термостабильность фермента. Не наблюдался защитный эффект и при добавлении смеси рибосомных белков (результаты не приведены). Эти данные позволяют исключить неспецифическое влияние рибосомных субчастиц и рибосом на лейцил-тРНК синтетазу печени кроликов, а также свидетельствуют о необходимости их нативной структуры для стабилизации фермента.

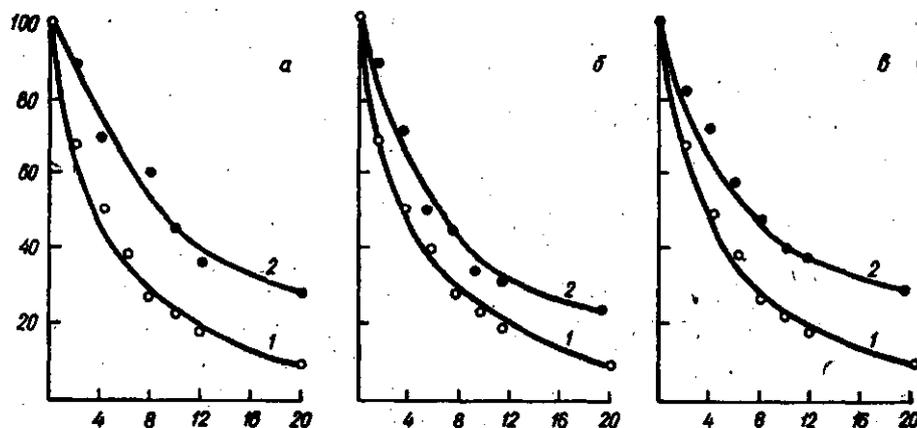
Таблица 1
Термоинактивация аминоксил-тРНК синтетаз, ассоциированных с полирибосомами печени кролика и освобожденных от полирибосом (усреднение по 4—6 опытам)

Аминокислотная специфичность	K_i , мин ⁻¹	
	Ассоциированные с полирибосомами	Освобожденные от полирибосом
Аргинин	0,09 ± 0,01	0,28 ± 0,02
Лейцин	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Лизин	0,09 ± 0,01	0,35 ± 0,03
Валин	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,02

Таблица 2
Влияние рибосом, субчастиц рибосом, БСА и рРНК на термостабильность лейцил-тРНК синтетазы в составе высокомолекулярного комплекса аминоксил-тРНК синтетаз из печени кролика

Эффектор	K_i , мин ⁻¹
—	0,16
80S рибосома	0,07
40S субчастица рибосом	0,08
60S субчастица рибосом	0,09
БСА	0,10
рРНК	0,13

Таким образом, полученные нами результаты соответствуют литературным данным о том, что ассоциация аминоктил-тРНК синтетаз с рибосомами или с компонентами мембран значительно повышает их устойчивость к тепловой инактивации. Так, например, фенилаланил-тРНК синтетаза из печени крыс в ассоциированном с рибосомами состоянии более термостабильна, чем в свободном [8]. Показано, что добавление



Термоинактивация лейцил-тРНК синтетазы в составе высокомолекулярного комплекса аминоктил-тРНК синтетаз из печени кролика в присутствии 60S (а), 40S (б) субчастиц рибосом и 80S рибосом (в) при 42 °С. По оси абсцисс — длительность прогревания (мин); по оси ординат — остаточная активность фермента (%); 1 — без добавления рибосом; 2 — в присутствии рибосом

рибосом к лейцил- и аргинил-тРНК синтетазам предупреждает их термоинактивацию [9]. Можно предположить, что присутствие рибосом предотвращает конформационные изменения аминоктил-тРНК синтетаз при термоинактивации, которые ведут к потере ферментативной активности.

Авторы выражают благодарность Т. В. Демченко за предоставление препаратов суммарной тРНК из печени кролика.

Summary The thermostability of free and associated with polyribosomes aminoacyl-tRNA synthetases from rabbit liver has been studied. The enzymes associated with polyribosomes are more stable to heat inactivation than the free ones. The 80S ribosomes as well as the 40S and 60S ribosomal subunits induce an increase in the thermostability of leucyl-tRNA synthetase in the high-molecular-weight complex from rabbit liver.

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. Alzhanova A. T., Fedorov A. N., Ovchinnikov L. P. Aminoacyl-tRNA synthetases of rabbit reticulocytes with and without the ability to bind high-M_r RNA // *FEBS Lett.*—1982.—144, N 1.—P. 149—153.
3. Федоров А. Н., Альжанова А. Т., Овчинников Л. П. Ассоциация эукариотических аминоктил-тРНК-синтетаз с полирибосомами // *Биохимия.*—1985.—50, № 10.—С. 1639—1645.
4. Splrin A. S., Ajtkhozhin M. A. Informosomes and polyribosome-associated proteins in eukaryotes // *Trends Biochem. Sci.*—1985.—10, N 4.—P. 162—165.
5. Graf H. Interaction of aminoacyl-tRNA synthetases with ribosomes and ribosomal subunits // *Biochem. et biophys. acta.*—1976.—425, N 2.—P. 175—184.
6. Изучение надмолекулярной организации эукариотических аминоктил-тРНК синтетаз / А. В. Ельская, Л. Л. Иванов, А. Д. Яремчук и др. // *Укр. биохим. журн.*—1986.—58, № 6.—С. 15—22.
7. Изучение взаимодействия эукариотических аминоктил-тРНК синтетаз с полирибосомами // З. П. Мартинкус, Л. Л. Иванов, А. В. Лекис и др. // *Вопр. мед. химии.*—1990.—36, № 5.—С. 6—8.
8. Phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetase activity associated with rat liver ribosomes and microsomes / J. S. Tscherne, I. B. Weinstein, K. W. Lanks et al. // *Biochemistry.*—1973.—12, N 20.—P. 3859—3865.

9. *Leucyl-tRNA* and *arginyl-tRNA* synthetases of wheat germ. Inactivation and ribosome effect / J.-R. Carias, M. Mouricout, B. Quintard et al. // *Eur. J. Biochem.*—1978.—87, N 3.—P. 583—590.
10. *Потапов А. П., Овчаренко Г. В., Солдаткин К. А.* Получение и характеристика 40S- и 60S-субчастиц рибосом из печени кролика / *Методы молекуляр. биологии: Сб. науч. тр.*—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 100—105.
11. *Берестецкая Ю. В., Смирнов В. В., Сургучев А. П.* Двухмерный электрофорез рибосомных белков из штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, несущих рецессивную супрессорную мутацию // *Биол. науки.*—1981.—№ 3.—С. 20—21.
12. *Шеррер К.* Выделение РНК и изучение ее свойств с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы // *Методы вирусологии и молекуляр. биологии.*—М.: Мир, 1972.—С. 337—354.
13. *Изучение комплексов аминоксил-тРНК синтетаз печени кролика при экспериментальном инфаркте миокарда / Л. Л. Иванов, Л. Ю. Лукшявичюс, М. И. Коваленко и др. // Укр. биохим. журн.*—1983.—55, № 4.—С. 368—371.
14. *Распределение лейцил-тРНК синтетазной активности в безрибосомных экстрактах печени кролика и миокарда свиньи / Л. Л. Иванов, З. П. Мартинкус, Р. Р. Стапуленис и др. // Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 3.—С. 67—70.
15. *Chuang H. J. K., Bell F. E.* Use of a thermal inactivation technique to obtain binding constants for the *Escherichia coli* valyl-tRNA synthetase // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1972.—152, N 2.—P. 502—514.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев
Каунас. мед. академия

Получено 11.09.91

УДК 577.216.3

Б. К. Искаков, К. И. Мадин

ОБНАРУЖЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА 45S РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ ЧАСТИЦ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

В субрибосомной фракции цитоплазматического экстракта зародышей пшеницы обнаружены относительно гомогенные (45S) рибонуклеопротеидные (РНП) частицы, содержащие значительное количество быстрометящейся РНК. Величина плавучей плотности 45S РНП-частиц в градиенте концентрации CsCl составляет 1,50 г/см³ и следовательно, они не являются свободными цитоплазматическими информосомами. В состав частиц входят: 17S рРНК, быстрометящаяся гетерогенная (6-16S) РНК, обладающая высокой матричной активностью, и ряд низкомолекулярных РНК, из которых наиболее представлена РНК (5,3S) длиной 135 нуклеотидов. Анализ белков 45S частиц двухмерным электрофорезом выявил две группы полипептидов. Первая группа представлена типичными структурными белками рибосом (M_r 10 000—50 000). Ко второй группе можно отнести высокомолекулярные полипептиды (40 000—120 000), среди которых, вероятно, присутствуют полипептиды факторов инициации трансляции. Предполагается, что 45S РНП-частицы представляют собой нативный преинициаторный трансляционный комплекс [мРНК·40S·eIF·Met-tRNA_i·GTP], который может накапливаться *in vivo* как интермедиат инициации трансляции.

Введение. В цитоплазме эукариотических клеток мРНК находится в составе как полирибосомных, так и внеполирибосомных рибонуклеопротеидных (мРНП) частиц. Эти частицы были названы «информосомами» как переносчики структурной информации [1]. Цитоплазматические внеполирибосомные (свободные) информосомы имеют универсальное распространение в эукариотических клетках и представляют собой класс частиц, отличающихся от рибосом и их субъединиц по коэффициентам седиментации и плавучей плотности в CsCl [2, 3]. Свободные информосомы обладают рядом характерных общих свойств, главным из которых является то, что их коэффициент седиментации зависит от такового образующей их мРНК и превышает его в 2—2,5 раза. При этом плавучая плотность информосом в CsCl составляет от 1,36 до 1,48 г/см³, причем плотность главного компонента всегда равна 1,40 г/см³ независимо от коэффициента седиментации [4].

Вместе с тем в цитоплазме ряда клеток животных обнаружены относительно гомогенные РНП-частицы с коэффициентом седиментации