

We have studied the distribution of SerRS in organs and tissues of the different species of Vertebrates by immunochemical methods. It is shown that the highest SerRS level is observed in the liver (from fish to humans). SerRS partially exists in the form of high-molecular complex that is stable in the lysates even under denaturing conditions.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудзера О. И., Сидорик Л. Л., Золотухина И. М. и др. Исследование серил-тРНК синтетазы быка иммунохимическими методами // Биополимеры и клетка.—1990.— 6.— С. 105—107.
2. Sidorik L. L., Gudzera O. I., Dragovoz V. A. et al. Immunochemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // FEBS Lett.—1991.— 292.— P. 76—78.
3. Киселева Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.— 408 с.
4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem.—1976.— 72.— P. 248—254.
5. Laemmli U. K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.— 227.— P. 670—675.
6. Dang C. V., Dang C. V. Higher eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases in physiologic and pathologic states // Mol. and Cel. Biochem.—1986.— 71.— P. 107.
7. Mirande M., Gache Y., Le Corre D., Waller J.-P. Seven mammalian aminoacyl-tRNA synthetases copurified as high molecular weight complexes are associated within the same complex // EMBO J.—1982.— 1.— P. 733.
8. Kellerman O., Brevet A., Tonetti H., Waller J.-P. Macromolecular complexes of aminoacyl-tRNA synthetases from eukaryotes. 1. Extensive precipitation and characterization of the high-molecular weight complexes of seven aminoacyl-tRNA synthetases from sheep liver // Eur. J. Biochem.—1979.— 99.— P. 541.
9. Yang D. C. H., Garcia J. V., Johnson Y. D., Wahab S. Multienzyme complexes of mammalian aminoacyl-tRNA synthetases // Curr. Top. Cel. Regul.—1985.— 26.— P. 325.
10. Киселева Л. Л. Аминоацил-тРНК синтетазы (кодазы) и их неканонические функции // Молекуляр. биология.—1990.— 24.— С. 1445.
11. Wahal S. Z., Yang D. C. H. Synthesis of diadenosine 5'-5'''-P<sup>1</sup>-P<sup>4</sup>-tetraphosphate by lysyl-tRNA synthetase and a multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver // J. Biol. Chem.—1985.— 260.— P. 5281.
12. Majumder A. L., Akins R. A., Wilkincon J.-G. et al. Involvement of tyrosyl-tRNA synthetase in splicing of group 1 introns in *Neurospora crassa* mitochondria: Biochemical and immunochemical analysis of splicing activity // Mol. and Cell. Biol.—1989.— 9.— P. 2089.
13. Pollard J. W., Galprine A. R., Clemens M. J. A novel role for aminoacyl-tRNA synthetases in the regulation of polypeptide chain initiation // Eur. J. Biochem.—1989.— 182.— P. 1.

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

Получено 22.05.92

УДК 577.217:616.127

**Т. К. Машанаускас, Л. Л. Иванов, Г. А. Родовичюс,  
Л. Ю. Лукошявичюс, А. К. Прашкявичюс**

#### **БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ ИЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА**

*Изучен уровень биосинтеза белка в бесклеточных системах из печени кролика в норме и через 12 ч после воспроизведения экспериментальной ишемии миокарда (ЭИМ). Показано, что повышение уровня включения [<sup>14</sup>C] лейцина в продукт трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе при ЭИМ связано с увеличением активности аминоацил-тРНК синтетаз. Электрофоретический анализ продуктов трансляции с последующей автордиографией указал на перераспределение при ЭИМ в спектре синтезируемых в бесклеточной системе белков.*

© Т. К. Машанаускас, Л. Л. Иванов, Г. А. Родовичюс, Л. Ю. Лукошявичюс,  
А. К. Прашкявичюс, 1992

**Введение.** Ишемия миокарда приводит к значительным нарушениям биосинтеза белка как в самой сердечной мышце [1], так и в печени [2]. Ранее в экспериментах *in vivo* мы показали, что через 12 ч после воспроизведения экспериментальной ишемии миокарда (ЭИМ) в печени кроликов снижается уровень биосинтеза белка [3]. Однако оставалось неясным, какие компоненты трансляционного аппарата клеток в первую очередь ответственны за нарушение белоксинтезирующих процессов при ЭИМ.

В данной работе представлены результаты изучения биосинтеза белка в бесклеточных системах из печени кролика при ЭИМ, а также факторов, влияющих на его уровень. Кроме того, проведен автордиографический анализ продуктов трансляции эндогенных мРНК бесклеточных белоксинтезирующих систем.

**Материалы и методы.** Для экспериментов использовали кроликов-самцов массой 2,5—3,5 кг. ЭИМ воспроизводили наложением лигатуры на переднюю нисходящую ветвь левой венечной артерии сердца кролика [4].

Препараты суммарных тРНК выделяли из печени кролика, используя метод Брунграбер [5], основанный на денатурации белков экстракта ткани фенолом с последующим фракционированием РНК на ДЭАЭ-целлюлозе.

Препараты полирибосом из печени кролика получали по методу Ветштейна и др. [6], а суммарные препараты аминоксил-тРНК синтез (АРСаз) — по методу Келлера и Замечника [7]. Смесь аминоксил-тРНК, в составе которых присутствовала [<sup>14</sup>C]лейцил-тРНК, выделяли, как описано в работе [8].

Бесклеточная белоксинтезирующая система в объеме 0,2 мл содержала: 50 мМ трис-НСI (рН 7,6), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 80 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0,5 мМ АТР, 0,2 мМ GTP, 10 мМ креатинфосфат, 1 мкг креатинфосфокиназы, 0,05 мМ каждую из нерадиоактивных аминокислот (кроме лейцина), 0,05 мМ [<sup>14</sup>C]лейцин, 10 мкг тРНК, 125 мкг суммарных АРСаз и 200 мкг полирибосом. Смесь инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,1 М КОН, пробы инкубировали 20 мин (для гидролиза аминоксил-тРНК) и осаждали 10 %-й трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Осадки собирали на нитроцеллюлозных фильтрах и промывали 5 %-й ТХУ. Радиоактивность определяли в толуоловом сцинтиляторе на счетчике «Delta 300» (Голландия).

Другой вид системы бесклеточного синтеза белка вместо аминокислот и тРНК содержал 300 мкг аминоксил-тРНК, в которых присутствовала [<sup>14</sup>C]лейцил-тРНК.

Активность АРСаз в суммарном препарате определяли по начальной скорости реакции аминокислирования тРНК. Инкубационная смесь в объеме 0,25 мл содержала: 100 мМ трис-НСI (рН 7,5), 2 мМ АТР, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl, 50 мкг АРСаз, 150 мкг тРНК и 2 мкл гидролизата <sup>14</sup>C-белка хлореллы. Пробы инкубировали 3 мин при 25 °С. Реакцию останавливали добавлением 10 %-й ТХУ и определяли радиоактивность проб, как описано выше.

Активность неорганической пирофосфатазы регистрировали по приросту неорганического фосфата в пробах после инкубации в течение 20 мин при 30 °С, как описано в работе [9].

Электрофорез белков в 13 %-м полиакриламидном геле в присутствии DS-Na проводили по методу Лэммли [10]. Для выявления продуктов трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе использовали метод автордиографии. Окрашенные гели обрабатывали препаратом Amplify («Amersham», США) в течение 1 ч, высушивали и экспонировали с пленкой РМ-В при температуре —80 °С 6—8 дней, после чего пленку проявляли.

**Результаты и обсуждение.** В работе использована комбинированная бесклеточная белоксинтезирующая система из печени кролика. В состав данной системы входили отдельно вносимые оптимальные ко-

личества ее компонентов. Об уровне биосинтеза белка судили по включению [ $^{14}\text{C}$ ] лейцина в продукт трансляции эндогенных мРНК. В предварительных экспериментах установлено, что внесение в бесклеточную систему из печени контрольных кроликов (норма) полирибосом из печени экспериментальных животных не оказывает влияния на уровень синтеза белка. Такая же ситуация повторялась и при изучении влияния тРНК (данные не приведены). Внесение же в систему бесклеточного синтеза белка из печени контрольных кроликов суммарных АРСаз, выделенных из печени через 12 ч после воспроизведения ЭИМ, значительно увеличивало уровень биосинтеза белка (табл. 1). С другой стороны, добавление АРСаз печени контрольных кроликов в систему из печени животных, которым воспроизводили ЭИМ, снижало биосинтез белка практически до контрольного уровня.

Таким образом, после воспроизведения ЭИМ трансляционный аппарат печени не теряет своей эффективности. Установленное нами ранее *in vivo* снижение уровня биосинтеза белка в печени при ЭИМ [3], по-видимому, связано с нарушением энергетического обеспечения клеток [11]. Используемая же в работе система бесклеточного синтеза белка содержала оптимальные количества энергетических соединений. Этим фактом можно объяснить разнонаправленность изменений уровня биосинтеза белка при ЭИМ, установленных *in vivo* и *in vitro*.

Полученные результаты позволили предположить, что увеличение уровня биосинтеза белка в бесклеточной системе при ЭИМ связано с повышением активности АРСаз. Для проверки этого предположения была определена активность этих ферментов в составе суммарных препаратов, выделенных из печени исследуемых групп животных. Из экспериментальных данных (табл. 2) следует, что через 12 ч после воспроизведения ЭИМ АРСазная активность печени кроликов в два раза превышает контрольное значение.

Увеличение активности АРСаз при ЭИМ может иметь компенсаторный характер в ответ на уменьшение акцепторной активности тРНК [12]. Так, появление при ишемии миокарда биологически неактивных форм тРНК, по-видимому, компенсируется более интенсивным использованием активных молекул, что требует высокой активности АРСаз. Одним из факторов, вызывающих повышение активности АРСаз при ЭИМ, может быть неорганическая пирофосфатаза, которая стимулирует образование аминоацил-тРНК, расщепляя неорганический пирофосфат, образующийся в ходе реакции активации аминокислот. Возможность регуляции такого рода показана для высокомолекулярных комплексов

Таблица 1

Уровень включения [ $^{14}\text{C}$ ] лейцина в продукт трансляции в бесклеточных белоксинтезирующих системах из печени кролика (нмоль на 1 мг рибосомной РНК за 1 мин;  $M \pm m$ ;  $n=10$ ) в норме и при ЭИМ

АРСаза	Система, содержащая аминокислоты и тРНК		Система, содержащая аминоацил-тРНК	
	тРНК и рибосомы, норма	тРНК и рибосомы, ЭИМ	Норма	ЭИМ
Норма	133,3 $\pm$ 8,3	139,7 $\pm$ 9,9	21,6 $\pm$ 1,8	24,6 $\pm$ 2,0
ЭИМ	255,1 $\pm$ 12,9	241,4 $\pm$ 12,5	—	—

Таблица 2

Аминоацил-тРНК синтетазная и пирофосфатазная активности суммарных препаратов АРСаз печени кролика ( $M \pm m$ ;  $n=8$ )

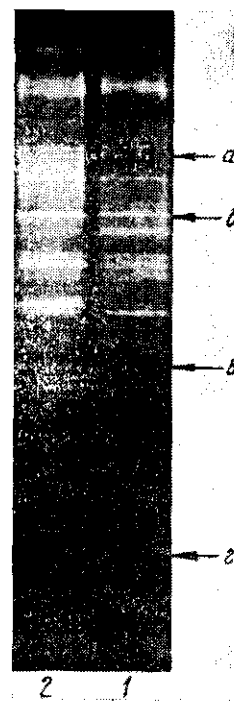
Фермент	Активность	
	Контроль	ЭИМ
АРСаза, имп. на 50 мкг белка за 1 мин	11228 $\pm$ 860	22256 $\pm$ 2209
Пирофосфатаза, 1 нмоль фосфата на 1 мг белка за 1 мин	20,2 $\pm$ 1,0	53,2 $\pm$ 2,2

АРСаз из миокарда свиньи и печени кролика при ЭИМ [9]. Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о резком увеличении при ЭИМ пиррофосфатазной активности суммарных препаратов АРСаз печени кролика. На основании этих данных можно предположить, что одной из причин увеличения активности АРСаз при ЭИМ может быть стимулирующее влияние неорганической пиррофосфатазы на реакцию аминоацилирования тРНК.

Вопрос о влиянии АРСаз на уровень биосинтеза белка исследован также с помощью бесклеточной системы, в состав которой вместо аминокислот и тРНК вносили смесь аминоацил-тРНК, содержащую [<sup>14</sup>C]лейцил-тРНК. В такой системе исключается протекание первого этапа трансляции (образование аминоацил-тРНК), в котором ключевую роль играют АРСазы, а происходит непосредственный процесс синтеза белка на рибосомах. Результаты исследований, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что в гомологичных бесклеточных системах при наличии оптимальных количеств предшественников в виде аминоацил-тРНК уровень биосинтеза белка практически одинаков.

Исходя из представленных выше данных можно предположить, что одним из основных факторов, ответственных за изменение уровня биосинтеза белка в печени при ЭИМ, являются АРСазы. С другой стороны, не исключено, что изменение функциональной активности АРСаз при ЭИМ отражается на спектре синтезируемых в печени цитоплазматических белков. Поэтому в последующих экспериментах был проведен анализ продуктов

Радиоавтография электрофореграммы белков, синтезируемых в бесклеточной системе из печени кролика в норме (1) и через 12 ч ЭИМ (2). Стрелками указаны положения маркерных белков: а — бычий сывороточный альбумин (67 000); б — овалбумин (43 000); в — химотрипсिनоген (25 000); г — миоглобин (18 000)



трансляции эндогенных мРНК в бесклеточных белоксинтезирующих системах из печени кроликов. Электрофоретическое исследование продуктов трансляции с последующей автордиографией указало на некоторое перераспределение при данной патологии в спектре синтезируемых белков (рисунок). Наиболее выраженные изменения наблюдаются в зонах с молекулярной массой (м. м.) 60 000—70 000 и 30 000—35 000. В этих зонах включение радиоактивной метки в синтезируемые белки в случае ЭИМ происходит гораздо интенсивнее, чем в норме. Причинами качественного изменения синтезируемых белков печени кроликов при ЭИМ могут быть перераспределение рибосомного материала между классами свободных и мембраносвязанных рибосом [13], а также изменение спектра транслируемых мРНК [14]. Можно также предположить, что увеличение при ЭИМ интенсивности включения радиоактивных аминокислот в зоне с м. м. 60 000—70 000 связано с синтезом стресс-белков, которые обнаруживаются в тканях при экстремальных состояниях организма. Так, например, в ишемизированной печени синтезируются два наиболее характерных стресс-белка с м. м. 70 000 и 89 000 [14]. Изучению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

**Summary.** The level of protein biosynthesis in cell-free systems from rabbit liver was studied both in norm and 12 h after experimental myocardial ischemia (EMI). The results demonstrate that the rise in the level of [<sup>14</sup>C]-leucine incorporation into translational product in cell-free system under EMI is related to the increase of amino-

acyl-tRNA synthetase activity. Electrophoretical analysis of the translational products with subsequent fluorography has revealed redistribution in the spectrum of the proteins synthesized in cell-free system under EMI.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Лекис А. В., Булдакова О. В., Коваленко М. И. и др. Белоксинтезирующая функция печени кроликов при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1985.— 54, № 1.— С. 57—60.
3. Лекис А. В., Машанаускас Т. К., Иванов Л. Л. и др. Влияние культивируемых клеток полисициаса на биосинтез белка в печени кроликов // Хим.-фарм. журн.— 1988.— 22, № 8.— С. 970—973.
4. Toteikis A., Dzeja P., Praskevicius A., Jasaitis A. Mitochondrial functions in ischemic myocardium // J. Mol. and Cell. Cardiol.— 1979.— 11, N 1.— P. 55—76.
5. Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1962.— 8, N 1.— P. 1—3.
6. 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.
7. Keller E. B., Zamecnik P. C. The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labeled amino acids into protein // J. Biol. Chem.— 1956.— 221, N 1.— P. 49—59.
8. Hellthaler G., Rotzsch W. Zur Molekularbiologie des Alterns-16. Mitteilung: Altersabhängige Veränderungen der Proteinbiosynthese in Polysomen-System // Z. Alternsforsch.— 1979.— 34, N 2.— S. 141—146.
9. Иванов Л. Л., Тамулявичюс А.-А. И., Лукошявичюс Л. Ю. и др. Аминоацил-тРНК-синтетазы и их высокомолекулярные комплексы при экспериментальной ишемии миокарда // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1326—1329.
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.
11. Машанаускас Т. К., Лекис А. В., Иванов Л. Л. и др. Влияние биомассы культивируемых клеток полисициаса на уровень АТР, АДР и АМР в печени кроликов при экспериментальной ишемии миокарда // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 3.— С. 75—76.
12. Лукошявичюс Л. Ю., Родовичюс Г. А., Коваленко М. И. и др. тРНК и аминокислот-тРНК-синтетазы печени кроликов при экспериментальном инфаркте миокарда // Вопр. мед. химии.— 1983.— 29, № 4.— С. 65—69.
13. Лекис А. В., Потапов А. П., Лукошявичюс Л. Ю. Изменения в пуле рибосом печени кроликов в ранние сроки экспериментального инфаркта миокарда // Молекуляр. биология.— 1984.— 37.— С. 22—25.
14. Barnelli-Zazzera A. Patterns of RNA and protein synthesis in post-ischemic livers // Free Rad. Res. Commun.— 1989.— 7, N 3—6.— P. 301—305.

Каунас. мед. академия, Литовская Республика

Получено 05.05.92

УДК 547.963.32:466.057

**С. Н. Ярмолюк, Е. М. Иванова, И. В. Кондратюк,  
И. В. Алексеева, А. С. Шаламай, В. Ф. Зарытова**

#### **ОЛИГОНУКЛЕОПЕПТИДЫ \***

#### **III. СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДИЛ-(P→N)-ПЕПТИДОВ**

*Синтезированы аргининсодержащие олигонуклеопептиды фосфамидного типа. Изучено влияние пептидной модификации на способность олигонуклеопептидов к аффинному связыванию и их устойчивость к трипсину.*

\* Приставка «дезокси» в обозначениях олигонуклеотидов опущена.