

УДК 577.152.211

Д. В. Вежляеве, Л. Э. Тарасевичене,
Л. Л. Иванов, А. А. Ясайтис, Л. Ю. Лукошявичюс**Влияние ишемии миокарда на агрегатное состояние
аминоацил-тРНК синтетаз и тРНК-метилтрансфераз
печени кроликов**

Проведено сравнение активности аминоксил-тРНК синтетаз (АРСаз) и тРНК-метилтрансфераз пострибосомного экстракта, полученного из печени кроликов в норме и через 12 ч после воспроизведения экспериментальной ишемии миокарда (ЭИМ), а также исследовано их распределение между фракциями высокомолекулярных комплексов и свободных ферментов. Установлено увеличение глутамил-, глицил-, лейцил-, лизил- и серил-тРНК синтетазных активностей при ЭИМ на 12—44 %. За этот же срок суммарная тРНК-метилтрансферазная активность увеличивается на 47 %. В случае ЭИМ среди продуктов метилирования субметилированных тРНК уменьшаются относительные доли t^1A , t^5C , t^5U , $O-t-R$ и увеличивается относительная доля t^7G . При гель-хроматографии пострибосомного экстракта на сефадексе G-300 аминоксил-тРНК синтетазная и тРНК-метилтрансферазная активности распределяются между фракцией высокомолекулярных комплексов (молекулярная масса > 1 МДа) и фракцией комплексов меньшей молекулярной массы и свободных белков. При ЭИМ наблюдается частичное перераспределение активности АРСаз и тРНК-метилтрансфераз из состава высокомолекулярных комплексов в более низкомолекулярные фракции, что может быть связано с изменением биосинтеза белка в печени при ишемии миокарда.

Введение. тРНК-метилтрансферазы (КФ 2.1.1) и АРСазы (КФ 6.1.1) выполняют важные функции в процессе биосинтеза белков, катализируя строгоспецифичное метилирование и аминокислотирование молекул тРНК соответственно [1, 2]. Отличительной особенностью эукариотических АРСаз является их способность образовывать высокомолекулярные комплексы друг с другом, а также с другими молекулами [2, 3]. На регуляторную роль комплексов АРСаз в процессе биосинтеза белков указывают данные о наличии в их составе ферментов процессинга тРНК, таких как рибонуклеазы [4, 5], тРНК-сульфотрансфераза [6], тРНК-метилтрансферазы [7-9]. Высказано предположение о том, что ассоциация АРСаз и тРНК-модифицирующих ферментов в высокомолекулярные комплексы может уменьшать число ошибок при включении аминокислот в синтезируемые белки [10]. Несмотря на интенсивные многолетние исследования структуры и свойств АРСаз и тРНК-метилтрансфераз животного происхождения, наименее изученным остается вопрос об особенностях их функционирования при различных физиологических и патологических состояниях организма, характеризующихся измененным уровнем биосинтеза белка в органах. Удобной модельной системой для такого рода исследований является ишемия миокарда, поскольку при этой патологии отмечены глубокие изменения скорости и уровня биосинтеза белка как в самой сердечной мышце [11], так и в других органах, в том числе и в печени [12].

В данной работе проведено сравнительное изучение активности и агрегатного состояния АРСаз и тРНК-метилтрансфераз в печени кроликов в норме и через 12 ч после воспроизведения ЭИМ.

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 [13].

Получение пострибосомного экстракта из печени кролика и гель-хроматография его на сефадексе G-200 описаны ранее [14].

Активность каждого вида АРСаз определяли по начальной скорости реакции аминоацилирования тРНК при насыщающих концентрациях субстратов. Состав стандартной реакционной смеси описан в работе [15].

Для определения активности тРНК-метилтрансфераз в качестве донора метильных групп использовали [метил-¹⁴C]-S-аденозил-L-метионин. Акцептором метильных групп служила субметилированная тРНК из *Escherichia coli* K12 W6. Реакцию метилирования проводили в 0,1 М трис-HCl буфере, pH 7,8, содержащем 0,3 М аммоний ацетат, 0,01 М дитиотреитол, 0,01 М натрий этилендиаминтетраацетат и 0,02 мкмоль [метил-¹⁴C]-S-аденозил-L-метионина. Общий объем инкубационной смеси составлял 0,15 мл. Инкубацию осуществляли при температуре 37 °С в течение 30 мин. Из реакционной смеси отбирали аликваты по 0,05 мл и наносили на диски из хроматографической бумаги Whatman N1. Диски промывали холодной трихлоруксусной кислотой и смесью этанол — эфир. Радиоактивность определяли в толуоловом сцинтиляторе на счетчике «Delta 300» (Голландия).

Метилированную тРНК гидролизовали 1 М HCl в течение 1 ч при температуре 100 °С. Гидролизат фракционировали в тонком слое целлюлозы «FND» [16].

Результаты и обсуждение. В работе проведено сравнение активности АРСаз и тРНК-метилтрансфераз пострибосомного экстракта, полученного из печени кроликов в норме (контроль) и через 12 ч после воспроизведения ЭИМ, а также исследовано их распределение между фракциями высокомолекулярных комплексов и свободных ферментов. Результаты, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о достоверном увеличении при ЭИМ глутамил-, глицил-, лейцил-, лизил- и серил-тРНК синтетазных активностей на 12—44 %. За этот же срок ЭИМ суммарная тРНК-метилтрансферазная активность увеличивается на 47 %. Поскольку активность каждой индивидуальной тРНК-метилтрансферазы может существенно отличаться от суммарной активности этих ферментов, в дальнейших исследованиях был изучен вклад отдельных тРНК-метилтрансфераз пострибосомного экстракта печени кроликов в суммарную активность в норме и через 12 ч после

Таблица 1
Аминоацил-тРНК синтетазная и тРНК-метилтрансферазная активности пострибосомного экстракта печени кроликов в норме и через 12 ч после воспроизведения ЭИМ ($M \pm m$; $n = 6$; $p < 0,05$)

Аминокислотная специфичность	АРСаза	Контроль	ЭИМ
Аминоацил-тРНК синтетазная активность*			
Glu		25 ± 2	36 ± 2
Gly		63 ± 4	85 ± 5
Leu		121 ± 5	136 ± 2
Lys		54 ± 4	70 ± 4
Ser		77 ± 4	98 ± 3
тРНК-метилтрансферазная активность**			
		17 ± 2	25 ± 2

* пмоль аминоацил-тРНК на 1 мг белка за 1 мин;

** пмоль СН₃-групп на 1 мг белка за 30 мин.

Таблица 2

Компоненты, образуемые при метилировании тРНК из *E. coli* K12 W6 тРНК-метилтрансферазами печени кроликов в течение 30 мин (% от общей радиоактивности; $M \pm m$; $n = 9$)

Метилированные компоненты	Контроль	ЭИМ
m^5U	$2,1 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,3$
m^5C	$19,5 \pm 2,5$	$16,5 \pm 0,9$
m^1G	$14,7 \pm 1,1$	$15,4 \pm 3,3$
m^7G	$8,6 \pm 0,6$	$14,2 \pm 2,0$
m^2G	$35,4 \pm 1,4$	$38,4 \pm 4,0$
m_2^2G	$7,2 \pm 1,2$	$6,6 \pm 1,6$
m^1A	$9,3 \pm 1,5$	$5,2 \pm 1,1$
O-m-R	$3,2 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2$

воспроизведения ЭИМ. Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что суммарная тРНК-метилтрансферазная активность печени кроликов — это результат действия по крайней мере восьми разновидностей тРНК-метилтрансфераз, образующих остатки 5-метилурацила (m^5U), 5-метилцитозина (m^5C), 1-метилгуанина (m^1G), 7-метилгуанина (m^7G), 2-метилгуанина (m^2G), 2-диметилгуанина (m_2^2G), 1-метиладенина (m^1A) и оксиметилрибозы (O-m-R). Количественно преобладающими продуктами метилирования являются m^1G , m^2G и m^5C ; минорными метилированными основаниями — m^5U и углеводный остаток (O-m-R). В случае ЭИМ качественный состав тРНК-метилтрансфераз не меняется, однако понижаются относительные доли m^1A , m^5C , m^5U , O-m-R и повышается относительно: доля m^7G .

Наблюдаемое при ЭИМ увеличение аминоксил-тРНК синтетазных активностей в пострибосомном экстракте печени кроликов может быть связано со стимуляцией синтеза ферментов и увеличением содержания либо с их активацией под влиянием цитоплазматических факторов. Одним из известных факторов, регулирующих аминоксил-тРНК синтетазную активность, является неорганическая пирофосфатаза. Ранее мы показали наличие корреляции между аминоксил-тРНК синтетазной активностью и содержанием либо активностью неорганической пирофосфатазы в высокомолекулярных комплексах АРСаз, полученных из печени кролика и миокарда свиньи при ишемии миокарда [17]. Можно также предположить, что увеличение аминоксил-тРНК синтетазных активностей при ЭИМ является проявлением компенсаторной реакции клетки на уменьшение акцепторной активности тРНК за счет образования биологически неактивных конформеров [15]. Одна из причин появления этих конформеров может быть связана с изменением активности отдельных тРНК-метилтрансфераз.

Далее было исследовано распределение аминоксил-тРНК синтетазной и тРНК-метилтрансферазной активностей во фракции пострибосомного экстракта печени кроликов. Используя гель-хроматографию этого экстракта на сефадексе G-200, удалось показать, что активность изученных АРСаз распределяется между фракцией высокомолекулярных комплексов (молекулярная масса > 1 МДа) и фракцией, включающей аминоксил-тРНК синтетазные комплексы меньшей молекулярной массы и свободные белки (рис. 1). тРНК-метилтрансферазы кохроматографируются с АРСазами, что указывает на взаимную агрегацию этих ферментов.

Результаты изучения уровня аминоксил-тРНК синтетазной и тРНК-метилтрансферазной активностей в белковых фракциях, полученных при хроматографии пострибосомного экстракта печени кроликов на колонке с

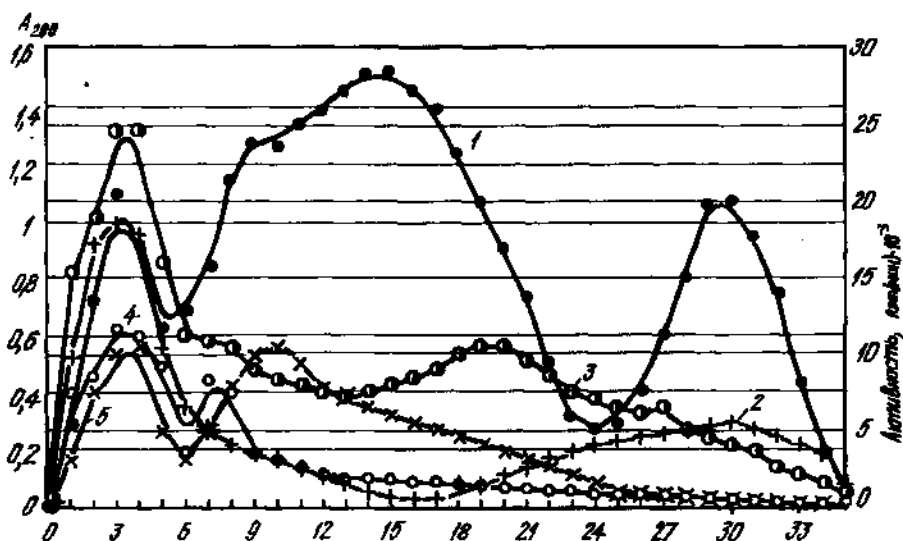


Рис. 1. Распределение аминокцил-тРНК синтетазной и тРНК-метилтрансферазной (MT) активностей пострибосомного экстракта печени кролика при гель-хроматографии на сефадексе G-200: 1 — A_{280} ; 2 — Leu; 3 — Glu; 4 — Lys; 5 — MT

сефадексом G-200, указывают на то, что удельная активность глутамил-, лейцил- и лизил-тРНК синтетаз выше в составе высокомолекулярного комплекса (рис. 2). Активности глицил-тРНК синтетазы и тРНК-метилтрансфераз в составе высокомолекулярного комплекса и в более низкомолекулярных фракциях практически одинаковы. Активность серил-тРНК синтетазы выше в более низкомолекулярных фракциях. Через 12 ч после воспроизведения ЭИМ наблюдается увеличение глутамил-, лейцил- и лизил-тРНК синтетазных активностей во фракции высокомолекулярного комплекса, которое еще резче выражено во фракции низкомолекулярных

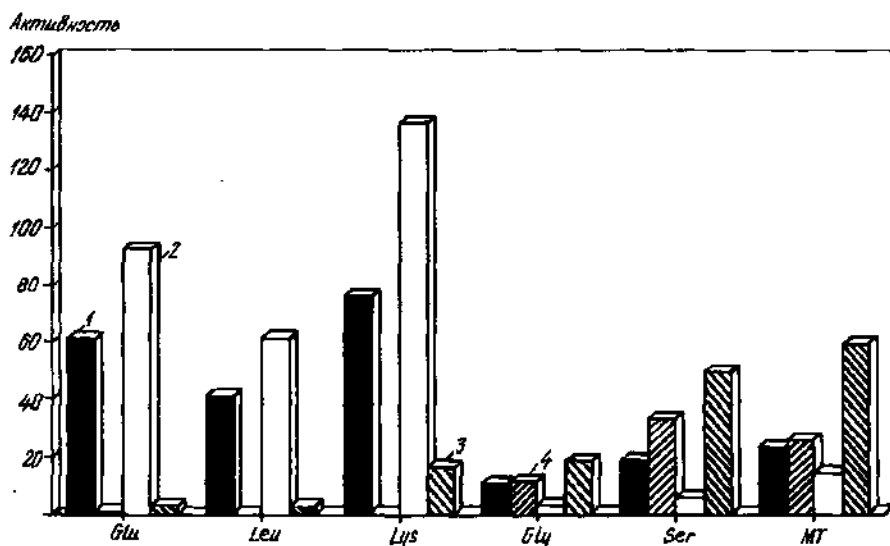


Рис. 2. Аминокцил-тРНК синтетазная и тРНК-метилтрансферазная (MT) активности в белковых фракциях различной молекулярной массы после хроматографического разделения на колонке с сефадексом G-200. Единицы активности, как в табл. 1. 1 — фракция высокомолекулярного комплекса (контроль); 2 — фракция высокомолекулярного комплекса (ЭИМ); 3 — низкомолекулярная фракция (ЭИМ); 4 — низкомолекулярная фракция (контроль)

комплексов и свободных белков. Следовательно, отношение значений этих аминоктил-тРНК синтетазных активностей в высокомолекулярном комплексе к таковым в более низкомолекулярных фракциях при ЭИМ уменьшается. Удельные активности глицил- и серил-тРНК синтетаз, а также тРНК-метилтрансфераз при ЭИМ уменьшаются в составе высокомолекулярных комплексов и увеличиваются во фракции низкомолекулярных комплексов и свободных белков. Эти данные могут свидетельствовать о частичном перераспределении АРСаз и тРНК-метилтрансфераз из состава высокомолекулярных комплексов в более низкомолекулярные фракции вследствие влияния ишемии миокарда.

Приведенные выше результаты указывают на нарушение ассоциации АРСаз и тРНК-метилтрансфераз в высокомолекулярные комплексы при ЭИМ. Представляется вероятным, что степень агрегации не только АРСаз [18], но и других ферментов, участвующих в процессе биосинтеза белка, играет определенную роль в регуляции начальных стадий трансляции и всего процесса в целом. Нарушение надмолекулярной организации в системе метилирования и аминоктирования тРНК может быть одной из предпосылок обнаруженного подавления синтеза белков в органах, подвергнутых ишемии [11, 12].

Д. В. Вязелене, Л. Я. Тарасевичене, Л. Л. Иванов, А. А. Ясайтис, Л. Ю. Лукошявичюс

ВПЛИВ ІШЕМІЇ МІОКАРДА НА АГРЕГАЦІЙНИЙ СТАН АМІНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗ І тРНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ ПЕЧІНКИ КРОЛІВ

Резюме

У роботі порівняно активності аміноацил-тРНК синтетаз (АРСааз) і тРНК-метилтрансфераз пострибосомного екстракту, отриманого із печінки кролів за норми та через 12 год після відтворення експериментальної ішемії міокарда (ЕІМ), а також досліджено їх розподіл між фракціями високомолекулярних комплексів і вільних ферментів. Встановлено зростання глютаміл-, глицил-, лейцил-, лізил- і серил-тРНК синтетазних активностей при ЕІМ на 12—44 %. За цей же строк сумарна тРНК-метилтрансферазна активність зростає на 47 %. В разі ЕІМ серед продуктів метилювання субметилюваних тРНК зменшуються відносні долі m^1A , m^1C , m^1U , $O-m-R$ та збільшується відносна доля m^1G . При гел-хроматографії пострибосомного екстракту на септадексі G-200 аміноацил-тРНК синтетазна і тРНК-метилтрансферазна активності розподіляються між фракцією високомолекулярних комплексів (молекулярна маса > 1 МДа) і фракцією комплексів меншої молекулярної маси та вільних білків. При ЕІМ спостерігається частковий перерозподіл активності АРСаз і тРНК-метилтрансфераз із складу високомолекулярних комплексів до більш низькомолекулярної фракції, що може бути пов'язано із зміною біосинтезу білка у печінці при ішемії міокарда.

D. V. Viazeliene, L. E. Taraseviciene, L. L. Ivanov, A. A. Jasaitis, L. J. Lukosevicius

THE EFFECTS OF MYOCARDIAL ISCHEMIA ON THE AGGREGATE STATE OF RABBIT LIVER AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES AND tRNA METHYLTRANSFERASES

Summary

The activities of aminoacyl-tRNA synthetases and tRNA methyltransferases in postribosomal extracts from normal rabbit liver and 12 hr after experimental myocardial ischemia (EMI), as well as their distribution between high-molecular-mass complexes and free enzymes fractions, have been compared. An increase in the activity of glutamyl-, glycyl-, leucyl-, lysyl- and seryl-tRNA synthetases by 12—44 % has been determined under EMI. The total tRNA methyltransferase activity is increased up to 47 %. In the case of EMI among the methylated products of submethylated tRNA the contents of m^1A , m^1C , m^1U , $O-m-R$ are decreased, and the content of m^1G is increased. Gel chromatography of the postribosomal extract on a Sephadex G-200 column shows that aminoacyl-tRNA synthetase and tRNA-methyltransferase activities are distributed between the high-molecular-mass complex ($M_r > 1 \cdot 10^6$ daltons) and fractions of lower molecular mass complexes and free enzymes. In the of EMI aminoacyl-tRNA synthetase and tRNA methyltransferase activities are partly redistributed from the

high-molecular-mass complex into the lower molecular mass fractions, what may be related to the alteration of protein biosynthesis in liver under myocardial ischemia.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Остерман Л. А.* Об участии тРНК в регулировании биосинтеза белка на уровне трансляции у эукариотов // Успехи биол. химии.—1980.—21.—С. 54—78.
2. *Ельская А. В., Стародуб Н. Ф., Потапов А. П. и др.* Регуляция биосинтеза белка у эукариот. — Киев: Наук. думка, 1990.—280 с.
3. *Mirande M.* Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications // *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.*—1991.—40.—P. 95—142.
4. *Saxholm H. I. K., Pitot H. C.* Characterization of a proteolipid complex of aminoacyl-tRNA synthetases and transfer RNA from rat liver // *Biochim. et biophys. acta.*—1979.—562, N 3.—P. 386—399.
5. *Vellekamp G. J., Kull F. J.* Allotropism in aspartyl-tRNA synthetase from porcine thyroid // *Eur. J. Biochem.*—1981.—118, N 2.—P. 261—269.
6. *Harris C. L., Martin K., Stewart D.* tRNA sulfurtransferase: a member of the aminoacyl-tRNA synthetase complex in rat liver // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1977.—79, N 3.—P. 657—662.
7. *Яремчук А. Д., Тарасявичене Л. Э., Кондратьев Т. П., Ельская А. В.* Аминоацил-тРНК синтетазы и их высокомолекулярные комплексы из регенерирующей печени крыс // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.—С. 1335—1341.
8. *Agris P. F., Playl T., Goldman L. et al.* Processing of tRNA is accomplished by a high-molecular weight complex // *Recent result cancer res.* — Berlin; Heidelberg: Springer, 1983.—Vol. 84.—P. 237—254.
9. *Agris P. F., Setzer D., Gehke C. W.* Characterization of a unique enzyme complex composed of S-adenosyl-L-methionine-tRNA-methyltransferase and aminoacyl-tRNA synthetase activities // *Nucl. Acids Res.*—1977.—4, N 1.—P. 3803—3819.
10. *Ryazanov A. G.* Does the complex of aminoacyl-tRNA synthetases and tRNA-modifying enzymes prevent miscoding? // *FEBS Lett.*—1984.—178, N 1.—P. 6—9.
11. *Praskevichius A., Maskoliunas R., Stapulionis R. et al.* Protein biosynthesis machinery under myocardial ischemia // *Exp. Biol.*—1990.—N 1.—P. 47—55.
12. *Лекис А. В., Машанаскас Т. К., Иванов Л. Л. и др.* Влияние культивируемых клеток полисианса на биосинтез белка в печени кроликов // *Хим.-фарм. журн.*—1988.—22, № 8.—С. 970—973.
13. *Toleikis A., Dzeja P., Praskevicius A., Jasaitis A.* Mitochondrial functions in ischemic myocardium // *J. Mol. and Cell. Cardiol.*—1979.—11, N 1.—P. 55—76.
14. *Иванов Л. Л., Лукошлявичюс Л. Ю., Коваленко М. И. и др.* Изучение комплексов аминоацил-тРНК синтетаз печени кролика при экспериментальном инфаркте миокарда // *Укр. биохим. журн.*—1983.—55, № 4.—С. 368—371.
15. *Лукошлявичюс Л. Ю., Родовичюс Г. А., Коваленко М. И. и др.* тРНК и аминоацил-тРНК синтетазы печени кроликов при экспериментальном инфаркте миокарда // *Вопр. мед. химии.*—1983.—29, № 4.—С. 65—69.
16. *Bjork G. K., Svensson J.* Analysis of methylated constituents from RNA by thin-layer chromatography // *Biochim. et biophys. acta.*—1967.—138, N 5.—P. 430—433.
17. *Иванов Л. Л., Тамулявичюс А.-А. Й., Лукошлявичюс Л. Ю. и др.* Аминоацил-тРНК синтетазы и их высокомолекулярные комплексы при экспериментальной ишемии миокарда // *Молекуляр. биология.*—1984.—18, № 5.—С. 1326—1329.
18. *Ivanov L. L., Martinkus Z., Kharchenko O. V. et al.* Subcellular distribution and properties of rabbit liver aminoacyl-tRNA synthetases under myocardial ischemia // *Mol. and Cell. Biochem.*—1993.—125, N 2.—P. 105—114.