

Сана Сара, Л. Л. Іванов, Г. В. Турковська,  
З. П. Мартинкус, М. І. Коваленко, Г. В. Єльська

## ВПЛИВ РИБОСОМ НА ТЕРМОСТАБІЛЬНІСТЬ АМІНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗ ПЕЧІНКИ КРОЛІВ

*Проведено порівняльне дослідження ступеню термостабільності вільних та асоційованих з полірибосомами аміноацил-тРНК синтетаз печінки кролів. Показано, що ферменти, виділені у асоційованому з полірибосомами стані, більш стійкі до теплової інактивзації, ніж у вільному. Встановлено, що додавання як 80S рибосом, так і 40S і 60S субчастинок рибосом підвищує термостабільність лейцил-тРНК синтетази у складі високомолекулярного комплексу печінки кролів.*

**Вступ.** Визначальні особливості еукаріотичних аміноацил-тРНК синтетаз полягають у їх здатності створювати високомолекулярні комплекси [1], зв'язуватися з високомолекулярною РНК [2] та асоціюватися з рибосомами [3]. Припускають [3, 4], що ці еволюційно набуті властивості необхідні аміноацил-тРНК синтетазам для їх компартменталізації у клітині в місцях функціонування. Крім того, показано, що у комплексах з рибосомами вони характеризуються підвищеною ферментативною активністю [5—7] та термостійкістю [8, 9]. Проте питання про безпосередній механізм синтетазно-рибосомної взаємодії залишається нез'ясованим.

У даній роботі проведено порівняльне дослідження ступеню термостабільності чотирьох вільних та асоційованих з полірибосомами аміноацил-тРНК синтетаз печінки кролів. Разом з тим вивчено вплив 80S рибосом та 40S і 60S субчастинок рибосом на термостабільність лейцил-тРНК синтетази у складі високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз, який, за даними Данга [1], у клітинах ссавців є пов'язаним з рибосомами.

**Матеріали і методи.** Одержання полірибосом. Печінку кролів гомогенізували у двох об'ємах 0,02 М трис-НСІ буферу (рН 7,5), який містив 0,03 М КСІ, 0,002 М MgCl<sub>2</sub>, 0,25 М сахарозу, 0,1 мМ дитіотреїтол, 0,1 мМ фенілметилсульфонілфторид. Гомогенат центрифугували при 12 000 об/хв на протязі 15 хв у роторі 6×25 мл у центрифугу К-24 (Німеччина) для видалення уламків клітин, ядер та мітохондрій. Надосадову рідину фільтрували крізь чотири шари марлі, на протязі 20 хв обробляли розчином, який містив тритон Х-100 (кінцева концентрація 2 %) та дезоксихолат натрію (1,3 %), нашаровували на 1 М сахарозу і центрифугували при 47 000 об/хв на протязі 2 год у роторі Т-50 у центрифугу УЦП-65. Отримані осадки полірибосом суспендували у буфері для гомогенізації, освітлювали центрифугуванням при 10 000 g на протязі 15 хв. Аміноацил-тРНК синтетази відділяли від рибосом промиванням 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 7,5), який містив 0,5 М КСІ, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,25 М сахарозу, на протязі 20 хв при 4 °С з наступним центрифугуванням при 105 000 g на протязі 90 хв.

Виділення 40S та 60S субчастинок рибосом детально описано у роботі [10]. Рибосомні білки з 40S та 60S субчастинок рибосом екстрагували, як наведено [11]. Рибосомну РНК віділяли з печінки кролів за методикою, запропонованою у роботі [12].

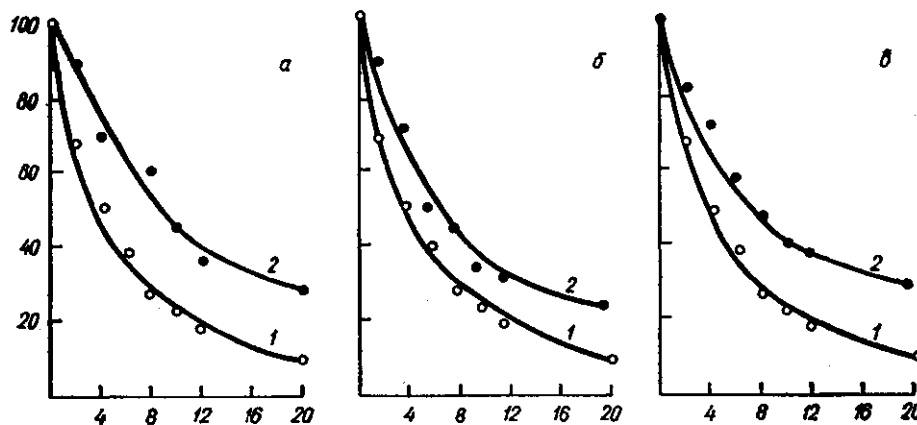
Виділення комплексу аміноацил-тРНК синтетаз. Високомолекулярний комплекс аміноацил-тРНК синтетаз віділяли з печінки кролів шляхом м'якої гомогенізації тканини з наступною хроматографією безрибосомної надосадової фракції на сефадексі G-200 [13].

Активність аміноацил-тРНК синтетаз визначали за початковою швидкістю реакції аміноацилювання тРНК при насичених

концентраціях субстратів. Склад реакційної суміші наведено у роботі [14].

Термоінактивацію аміноацил-тРНК синтетаз вивчали при 42°C. Константи швидкості термоінактивації визначали за методикою, що наведена у роботі [15]. Рибосоми і рибосомні субчастки для вивчення впливу на термостабільність лейцил-тРНК синтетази вносили до реакційної суміші у концентрації 0,7 мкМ.

**Результати і обговорення.** У табл. 1 наведено результати визначення ступеню термоінактивації чотирьох аміноацил-тРНК синтетаз.



Термоінактивація лейцил-тРНК синтетази у складі високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз з печінки кроля у присутності 60S (а), 40S (б) субчастинок рибосом та 80S рибосом (в) при 42°C. По осі абсцис — тривалість прогрівання (хв); по осі ординат — залишкова активність ферменту (%); 1 — без додавання рибосом; 2 — у присутності рибосом

Дані таблиці свідчать про те, що зазначені аміноацил-тРНК синтетази, які були виділені у асоційованому з полірибосомами стані, є більш стійкими до теплової інактивації, ніж вільні ферменти.

Які ж саме компоненти рибосом відповідають за підвищення стійкості аміноацил-тРНК синтетаз до температурного впливу? Для відповіді на це запитання ми дослідили вплив 40S і 60S субчастинок рибосом, а також 80S рибосом на термостабільність лейцил-тРНК синтетази, яка є компонентом високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз печінки кролів [13]. Дані, наведені на малюнку, свідчать про те, що додавання 80S рибосом, 40S та 60S субчастинок рибосом підвищує термостабільність лейцил-тРНК синтетази приблизно однаково. Задля перевірки специфічності стабілізуючої дії рибосом та їх субчастинок на

Таблиця 1  
Термоінактивація аміноацил-тРНК синтетаз, асоційованих з полірибосомами печінки кроля та вивільнених від полірибосом (середнє від 4—6 дослідів)

Амінокислотна специфічність	$K_t, \text{хв}^{-1}$	
	Асоційовані з полірибосомами	Вивільнені від полірибосом
Аргінін	$0,09 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,02$
Лейцин	$0,06 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
Лізин	$0,09 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,03$
Валін	$0,05 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$

Таблиця 2

Вплив рибосом, субчастинок рибосом, БСА та рРНК на термостабільність лейцил-тРНК синтетаз у складі високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз з печінки кроля

Ефектор	$K_t, \text{хв}^{-1}$
—	0,16
80S рибосома	0,07
40S субчастка рибосоми	0,08
60S субчастка рибосоми	0,09
БСА	0,10
рРНК	0,13

лейцил-тРНК синтетазу було вивчено термоінактивацію цього ферменту у присутності бичого сироватчинного альбуміну (БСА), рРНК, а також суміші екстрагованих рибосомних білків. З'ясувалося (табл. 2), що БСА виявляє слабкий протекторний вплив на лейцил-тРНК синтетазу печінки кролів, а рРНК практично не впливає на термостабільність ферменту. Не спостерігалось захисного ефекту і при додаванні суміші рибосомних білків (результати не наведено). Ці дані дозволяють виключити неспецифічний вплив рибосомних субчастинок і рибосом на лейцил-тРНК синтетазу печінки кролів, а також свідчать про необхідність їх нативної структури для стабілізації ферменту.

Таким чином, отримані результати відповідають літературним даним про те, що асоціація аміноацил-тРНК синтетаз з рибосомами або компонентами мембран значно підвищує їх стійкість до теплової інактивації. Так, наприклад, фенілаланіл-тРНК синтетаза з печінки щурів у асоційованому з рибосомами стані є більш термостабільною, ніж у вільному [8]. Показано, що додавання рибосом до лейцил- і аргиніл-тРНК синтетаз попереджає їх термоінактивацію [9]. Можна припустити, що присутність рибосом запобігає конформаційним змінам аміноацил-тРНК синтетаз при термоінактивації, які ведуть до втрати ферментативної активності.

Автори висловлюють вдячність Т. В. Демченко за надання препаратів сумарної тРНК з печінки кролів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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. Alphanova A. T., Fedorov A. N., Obchinnikov L. P. Aminoacyl-tRNA synthetases of rabbit reticulocytes with and without the ability to bind high-M<sub>r</sub> RNA // *FEBS Lett.*—1982.—144, N 1.—P. 149—153.
3. Федоров А. Н., Альжанова А. Т., Обчинников Л. П. Ассоциация эукариотических аминокислот-тРНК-синтетаз с полирибосомами // *Биохимия.*—1985.—59, № 10.—С. 1639—1645.
4. Spirin A. S., Ajtkhozhin N. 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 // *Biochim. et Biophys. Acta.*—1976.—425, N 2.—P. 175—184.
6. *Изучение надмолекулярной организации эукариотических аминокислот-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 аминокислот-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. Потанов 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., Сургуев А. П. Двухмерный электрофорез рибосомных белков из штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, несущих рецессивную супрессорную мутацию // *Биол. науки.*—1981.—№ 3.—С. 20—21.
12. Шерпер 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 аминокислот-тРНК синтетаз печени кролика при экспериментальном инфаркте миокарда* / Л. Л. Иванов, Л. Ю. Лукошявичюс, 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.

Ін-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ  
Каунас. мед. академія

Одержано 11.09.91