

УДК: 577.217.32:547.569.2

ВЛИЯНИЕ ПРОНИКАЮЩИХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА БИОСИНТЕЗ ПРОТЕИНОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ ПЕЧЕНИ КРЫС

А. К. ГУЛЕВСКИЙ, А. Ю. НИКОЛЬЧЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: lord_n2001@mail.ru*

Изучено влияние проникающих криопротекторов и ионов Mg^{2+} на протеинсинтезирующую активность надосадочной фракции постмитохондриального супернатанта (S_{15}) из гомогената печени крыс, а также влияние криопротекторов на процесс аминокислотирования. Добавление в бесклеточную систему проникающих криопротекторов — этиленгликоля и ДМСО — приводит к концентрационно-зависимому обратимому ингибированию биосинтеза протеинов и реакции аминокислотирования. В малых концентрациях указанные криопротекторы в бесклеточной системе потенцируют стимулирующее влияние Mg^{2+} на суммарный синтез протеинов.

Ключевые слова: биосинтез протеинов в бесклеточной системе, аминокислотирование, проникающие криопротекторы, ионы Mg^{2+} .

Известно, что проникающие криопротекторы обратимо ингибируют многие биохимические процессы в клетках [1–3]. Установлено, что добавление проникающих криопротекторов в среду с изолированными клетками асцитной карциномы Эрлиха приводит к обратимому подавлению биосинтеза протеинов [4, 5]. Кроме того установлено, что проникающие криопротекторы способны обратимо ингибировать транспорт аминокислот в изолированные клетки [5]. Вместе с тем, остается неясным, происходит ли ингибирование биосинтеза протеинов только на уровне блокирования транспорта аминокислот в клетку, либо в этот процесс вовлекаются и компоненты, непосредственно участвующие в процессе трансляции. Выяснение влияния проникающих криопротекторов (этиленгликоля и ДМСО) на биосинтез протеинов в постмитохондриальной фракции S_{15} из печени крыс является целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах в соответствии с положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» [6].

Выделение бесклеточной протеинсинтезирующей системы — фракции S_{15} — из печени крыс и определение ее активности. Фракцию S_{15} готовили в соответствии с методическими

рекомендациями, описанными в работе [7]. Печень крыс перфузировали средой А, содержащей в мМ: 50 — трис-НСl (рН 7,6), 25 — КСl, 5 — $MgCl_2$; 0,25 М сахарозы. Затем гомогенизировали ее в этой же среде в соотношении: 1 часть ткани и 2 части среды. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 15 000 g. Надосадочную жидкость — собственно фракцию S_{15} — собирали, удаляя, по возможности, верхний жировой слой.

Бесклеточную систему из печени крыс инкубировали в среде, в состав которой входили компоненты (в мМ): 1 — АТР, 0,1 ГТР, 10 — креатинфосфата, 16 мкг/мл креатинкиназы, 110 — КСl, 5 — $MgCl_2$ (кроме случаев, оговоренных в подписях к рисункам), 30 — трис НСl-буфера (рН 7,5), смесь 17 немеченых L-аминокислот (без лейцина) [7] по 0,04 мМ каждой и 0,1–0,2 мкКи/пробу ^{14}C -лейцина. В каждую из проб, общим объемом 100 мкл, добавляли 30 мкл фракции S_{15} , которая содержала (в зависимости от серии опытов) 0,4–0,6 мг протеина. Пробы инкубировали при 37 °С 15 минут. После окончания инкубации реакцию биосинтеза останавливали помещением проб в ледяную баню. Далее к пробам добавляли холодную 10%-ю ТХУ, гомогенизировали и прогревали в течение 20 минут при 90 °С. Затем пробы охлаждали, наносили на ультрафильтры РУФС. Фильтры подсушивали и просчитывали радиоактивность в стандартном толуольном сцинтилляторе на сцинтилляционном счетчике Интертехник SL-40 (Франция).

Аминоацилирование t-РНК. Проба 0,5 мл в мкМ содержала: 50 – трис-НСl (рН 7,5), 5 – АТР, 5 – КСl, 2 – MgCl₂, 2 – глутатиона восстановленного; 0,5 мкКи – ¹⁴С-лейцина, 35 мкг – t-РНК, 70 мкг – протеина. Для удаления эндогенных аминокислот t-РНК инкубировали 1 час при 37 °С в 0,1 М трис-НСl (рН 9,0). После этого препараты t-РНК трижды переосаждали этанолом и определяли акцепторную активность. К образованным аминокислотам t-РНК добавляли равный объем холодной 10%-й ТХУ, осадок наносили на ультрафильтры РУФС и промывали трижды холодной 5%-й ТХУ и 70%-ым этанолом. Фильтры подсушивали и просчитывали радиоактивность в стандартном толуольном сцинтилляторе на сцинтилляционном счетчике Интертехник SL-40 (Франция).

Гель-фильтрация постмитохондриального супернатанта через колонку с сефадексом G-25. Для гель-фильтрации фракции S₁₅ готовили колонку из сефадекса G-25 2,5x20 см. Колонка заполнялась и хранилась в бидистиллированной воде в течение 6 часов для полного набухания зерен сефадекса. Перед нанесением препарата колонку уравнивали колоночным буфером в мМ: 85 – КСl, 3,5 – MgCl₂, 30 – трис-НСl (рН 7,5). Фракцию S₁₅ собирали в отдельную емкость сразу же после выхода расчетного колоночного объема буфера. После прохождения через колонку с сефадексом, фракция S₁₅ содержала от 13 до 20 мг/мл протеина.

Статистическая обработка экспериментальных данных производилась с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

В представленных экспериментах было исследовано влияние содержания криопротекторов и ионов Mg²⁺ на протеинсинтезирующую активность фракции S₁₅ из печени крыс, включение аминокислот в протеины после удаления криопротекторов, а также влияние криопротекторов на процесс аминоацилирования.

Для проверки функциональности протеинсинтезирующей системы измеряли включение ¹⁴С-лейцина в суммарные протеины во фракции S₁₅ в присутствии некоторых ингибиторов протеинового синтеза (табл. 1). Контролем для данной серии экспериментов являлась фракция S₁₅ в среде, описанной в материалах и методах, без добавления криопротекторов и ингибиторов синтеза протеинов. Как видно из

табл. 1, циклогексимид подавляет синтез протеинов на 83%, пуромицин – на 93%, а присутствие РНК-азы приводит к почти полному прекращению включения ¹⁴С-лейцина в суммарные протеины в системе S₁₅.

Показано, что добавление этиленгликоля и ДМСО приводит к торможению включения меченых ¹⁴С-аминокислот во вновь синтезируемые суммарные протеины. Уровень торможения их биосинтеза определяется видом криопротектора и его концентрацией в среде.

Результаты исследований показали, что при малом содержании указанные проникающие криопротекторы не оказывают существенного влияния на процесс включения аминокислот в суммарные протеины в постмитохондриальном супернатанте (рис. 1). Ингибирующее действие ДМСО на включение ¹⁴С-лейцина в суммарные протеины является статистически достоверным по сравнению с контролем в 10%-й, а этиленгликоля – в 14%-й концентрации.

При добавлении в среду инкубации, содержащую фракцию S₁₅, криопротекторов – ДМСО или этиленгликоля – до содержания 30%, включение ¹⁴С-лейцина в суммарные протеины в среде инкубации полностью прекращается. Для проверки обратимости ингибирования биосинтеза протеинов из фракции S₁₅, содержащей 25% ДМСО или 30% этиленгликоля, указанные криопротекторы удаляли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25. Включение ¹⁴С-лейцина в суммарные протеины в пробах, в которых криопротекторы отсутствовали, использовали в качестве контроля. В контрольных образцах во фракцию S₁₅ добавляли буферную смесь в объемах, эквивалентных добавлению раствора ДМСО в опытах. Для последующего измерения протеинсинтезирующей активности, контрольные пробы фракции S₁₅ вносили в среду инкубации в количестве, указанном в материалах и методах. Показано, что ингибирующее воздействие этиленгликоля и ДМСО на синтез протеинов в системе S₁₅ носит обратимый характер (табл. 2). Необходимо отметить, что после удаления ДМСО уровень биосинтеза протеинов не только возвращается к прежним значениям, но и превышает их на 33%, что, возможно, связано с влиянием данного криопротектора на активность энзимов, участвующих в биосинтезе протеинов либо воздействием на структурно-функциональное состояние рибосом.

Учитывая данные литературы о важной роли ионов магния в процессах биосинтеза протеинов [8, 9], нами изучено влияние криопротекторов на степень включения ме-

Таблиця 1. Включение ^{14}C -лейцина в суммарные протеины во фракции S_{15} в средах с ингибиторами синтеза протеинов

Состав бесклеточной системы	n	Включение ^{14}C -лейцина в суммарные протеины (имп/мин·мг протеина), $M \pm m$	Сравнение с контролем	Процент от контроля
Полная система (контроль)	10	25130 \pm 2126	—	—
Полная система + 5 мМ циклогексимида	6	4201 \pm 726	$P < 0,001$	17
Полная система + 25 мкг/мл пурамицина	6	1663 \pm 347	$P < 0,001$	7
Полная система + 10 мкг/мл РНК-азы	6	796 \pm 150	$P < 0,001$	1,8

ченных аминокислот в суммарные протеины во фракции S_{15} в зависимости от содержания ионов Mg^{2+} . Из данных, представленных на диаграммах 2 и 3 (колонки «Контроль») видно, что существует зависимость уровня синтеза протеинов от содержания Mg^{2+} во фракции S_{15} . Наибольший уровень включения меченых аминокислот наблюдается при концентрации Mg^{2+} в среде 5 мМ.

Из рис. 2 и 3 (колонки «Контроль») можно видеть, что оптимум включения аминокислот в протеины во фракции S_{15} из печени крыс

наблюдается при молярной концентрации ионов Mg^{2+} в пробах от 3,75 до 5 мМ/л. При достижении концентрации Mg^{2+} 5 мМ, кривая включения меченых аминокислот выходит на плато и при дальнейшем добавлении MgCl_2 до больших концентраций уровень биосинтеза протеинов не повышается. При добавлении ДМСО в концентрации 4 М в инкубационную среду, где содержалось 3,75 и 5 мМ ионов Mg^{2+} , происходит почти полное подавление биосинтеза протеинов. При меньшей концентрации Mg^{2+} (0,625–2,5 мМ), включение меченых ами-

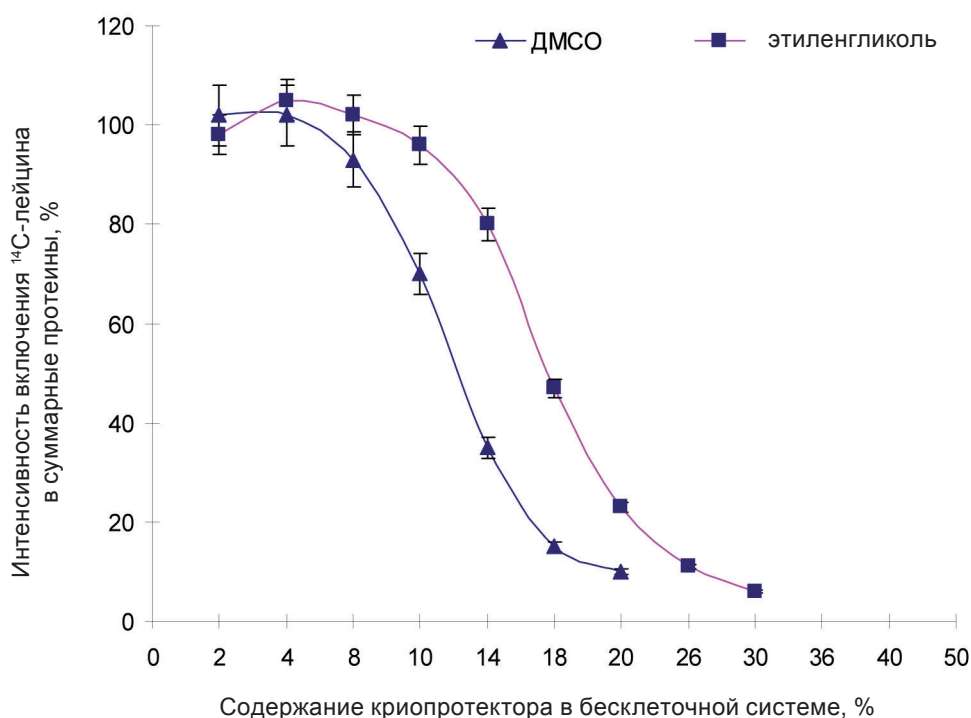


Рис. 1. Влияние проникающих криопротекторов на биосинтез протеинов во фракции S_{15} из печени крыс ($n = 6$); содержание MgCl_2 в бесклеточной системе — 5 мМ. За 100% принято включение ^{14}C -лейцина в суммарные протеины системы S_{15} в контроле

Таблица 2. Протеинсинтезирующая активность фракции S_{15} из печени крыс после удаления криопротекторов ($n = 6$)

Вид криопротектора	Концентрация криопротекторов в среде инкубации, %	Включение ^{14}C -лейцина в суммарные протеины (имп/мин-мг протеина) после удаления криопротекторов, $M \pm m$	Сравнение с контролем	Процент от контроля
Контроль	—	25130 ± 2126	—	—
Этиленгликоль	30	25268 ± 2358	$P > 0,05$	100
ДМСО	25	33253 ± 2995	$P < 0,001$	132

Содержание MgCl_2 в бесклеточной системе — 5 мМ. Удаление криопротекторов из S_{15} проводили с помощью гельфильтрации на сефадексе G-25

нокислот в общий протеин является достоверным по отношению к контролю при таком же содержании Mg^{2+} . Это особенно заметно при концентрации ионов Mg^{2+} — 0,625–1,25 мМ.

Добавление ДМСО в инкубационную среду при оптимальном (5 мМ) содержании

Mg^{2+} приводит сначала (при малых концентрациях криопротектора — до 0,6 М) к увеличению включения ^{14}C -лейцина в суммарные протеины, а при последующем увеличении концентрации криопротектора — к угнетению биосинтеза протеинов (рис. 2).

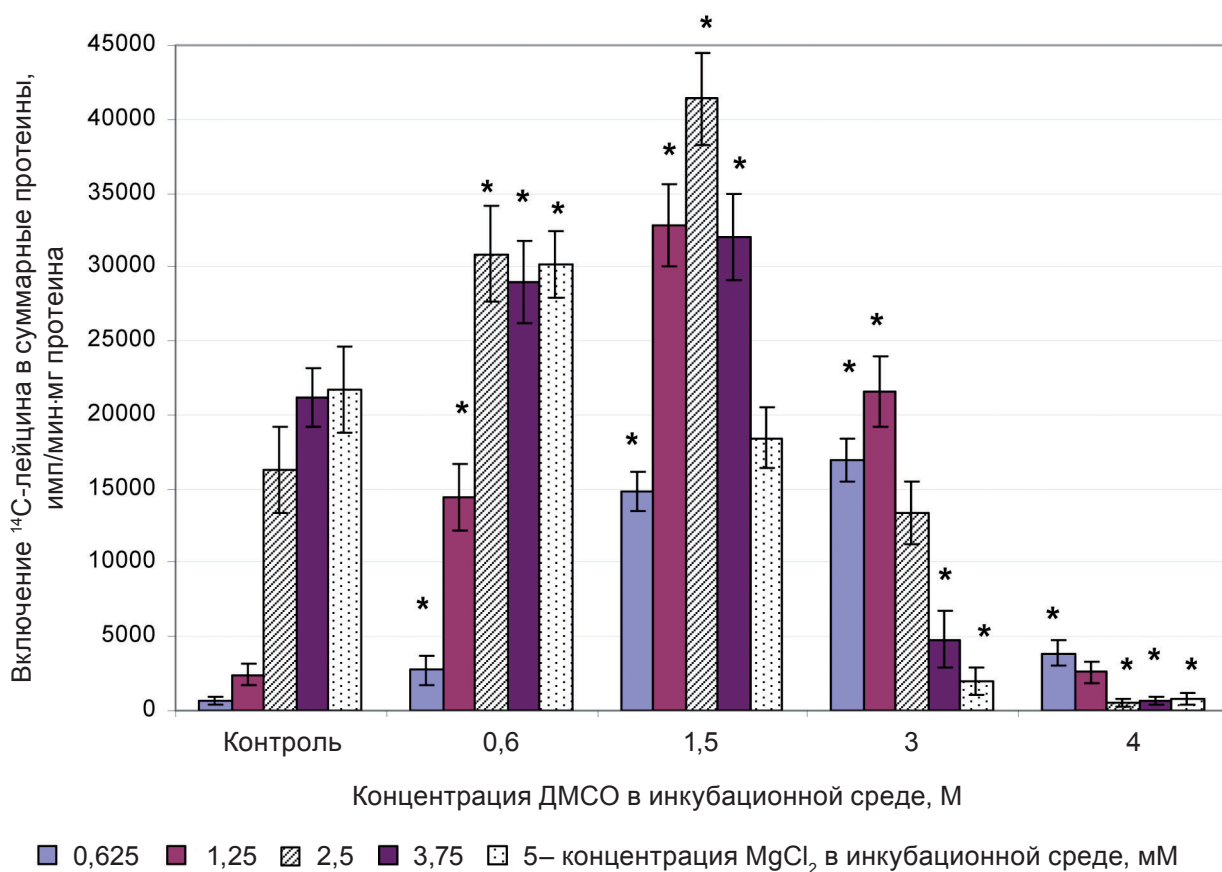


Рис. 2. Протеинсинтезирующая активность фракции S_{15} из печени крыс в зависимости от содержания Mg^{2+} и ДМСО в инкубационной среде ($n = 5$). * Достоверные различия при сравнении с включением ^{14}C -лейцина в суммарные протеины контрольных образцов, содержащих соответствующие концентрации MgCl_2

Наиболее наглядно потенцированное действие Mg^{2+} и криопротектора проявляется при содержании ДМСО в конечной концентрации в пробе 1,5 М. Из рис. 2 можно видеть, что при 1,25 и 2,5 мМ Mg^{2+} в среде уровень синтеза протеинов возрастает в 13,5 и в 2,5 раза соответственно по сравнению с контролем. При концентрации Mg^{2+} 5 мМ и 1,5 М ДМСО эффект потенцирования снижается и синтез протеинов протекает на уровне контрольных величин – разница в этом случае недостоверна ($P > 0,05$).

Подобное действие проявляет и другой проникающий криопротектор – этиленгликоль (рис. 3).

Из рис. 3 можно видеть, что при низком содержании в инкубационной среде этиленгликоль потенцирует действие Mg^{2+} . Так, оптимальное потенцирующее действие этиленгликоля проявляется при конечной концентрации в пробе 0,7 М этого криопротектора. Потенцирующее действие достоверно проявляется и

при малом содержании Mg^{2+} в среде (0,625 и 1,25 мМ), а также при «оптимальном» содержании этого иона – 5 мМ. При увеличении концентрации этиленгликоля в среде инкубации, потенцирующее действие криопротектора снижается. Из полученных данных видно, что при концентрации этиленгликоля в среде инкубации 5 М, уровень синтеза протеинов по сравнению с контролем снижается при содержании Mg^{2+} 5 мМ почти в 12 раз, при содержании этого иона 3,75 мМ – в 6,5 раза, а при 2,5 мМ – в 2,9 раза. Иная картина прослеживается при малом содержании Mg^{2+} в среде инкубации. При 0,625 и 1,25 мМ Mg^{2+} уровень синтеза протеинов достоверно превышает контрольные величины.

Таким образом, при повышении концентрации указанных криопротекторов протеинсинтезирующая активность постмитохондриального супернатанта снижается, а оптимум реакции сдвигается в область более низких концентраций ионов магния. Очевидно, что

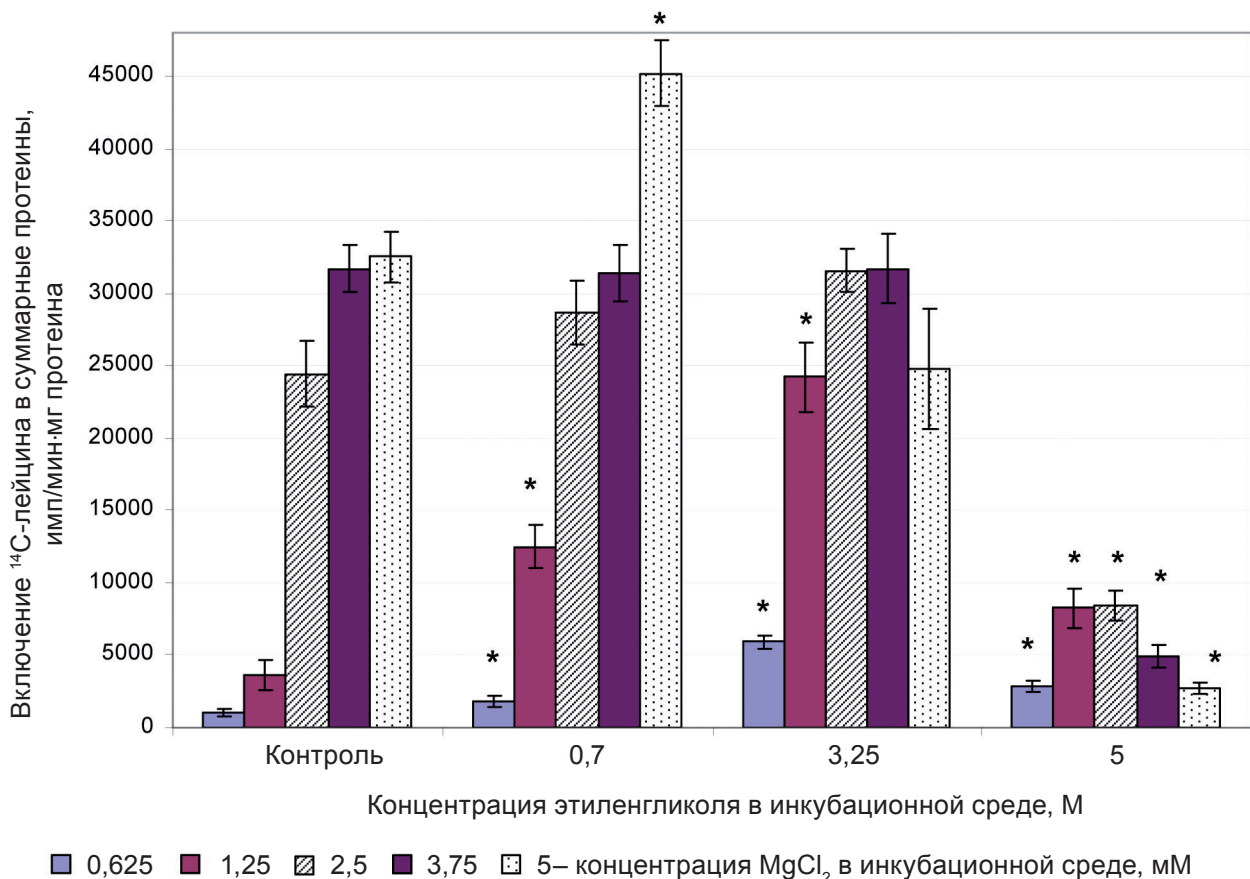


Рис. 3. Протеинсинтезирующая активность фракции S_{15} из печени крыс в зависимости от содержания Mg^{2+} и этиленгликоля в инкубационной среде ($n = 5$). *Достоверные различия при сравнении с включением ^{14}C -лейцина в суммарные протеины контрольных образцов, содержащих соответствующие концентрации $MgCl_2$

криопротекторы в небольших концентрациях потенцируют действие Mg^{2+} .

Как выяснилось в последующих экспериментах, криопротекторы оказывают ингибирующее влияние не только на биосинтез протеинов в целом, но и на один из основных этапов трансляции – аминокислотилирование.

На рис. 4 представлена практически линейная зависимость снижения реакции аминокислотилирования при повышении содержания криопротекторов в среде. Необходимо отметить, что в эффективных концентрациях для криообъектов (для ДМСО – до 10%, а для этиленгликоля – до 8%) как ДМСО, так и этиленгликоль существенно снижают реакцию аминокислотилирования (рис. 4). Добавление ДМСО в концентрации 1 М приводит к снижению реакции аминокислотилирования на 31%, а добавление этиленгликоля в концентрации 8% – на 48%. Установленное концентрационнозависимое ингибирование криопротекторами реакции аминокислотилирования указывает на значительные структурно-функциональные изменения ферментов синтеза протеинов в ингибированном протеинсинтезирующем аппарате.

Обсуждая возможные механизмы ингибирующего действия криопротекторов на биосинтез протеинов и на реакцию аминокислотилирования во фракции S_{15} , необходимо принимать во внимание следующие соображения. Во-первых, по-видимому, немаловажную роль играет изменение физико-химических свойств среды в присутствии криопротекторов, в частности, изменение диэлектрических свойств [10], что приводит к увеличению электростатических и уменьшению гидрофобных взаимодействий, чрезвычайно важных для поддержания ассоциированного состояния субъединиц рибосом. Это предположение подтверждается данными работы [8], в которой указывается, что некоторые водорастворимые органические растворители, такие как метанол, этанол, ДМСО и др., могут являться синергистами Mg^{2+} и частично заменить его в среде для поддержания ассоциированного состояния субъединиц рибосом. Антидиссоциирующее действие данных веществ приблизительно пропорционально их гидрофобности [8, 11]. По крайней мере, отчасти этот механизм лежит в основе ингибирования синтеза протеинов в наших экспериментах.

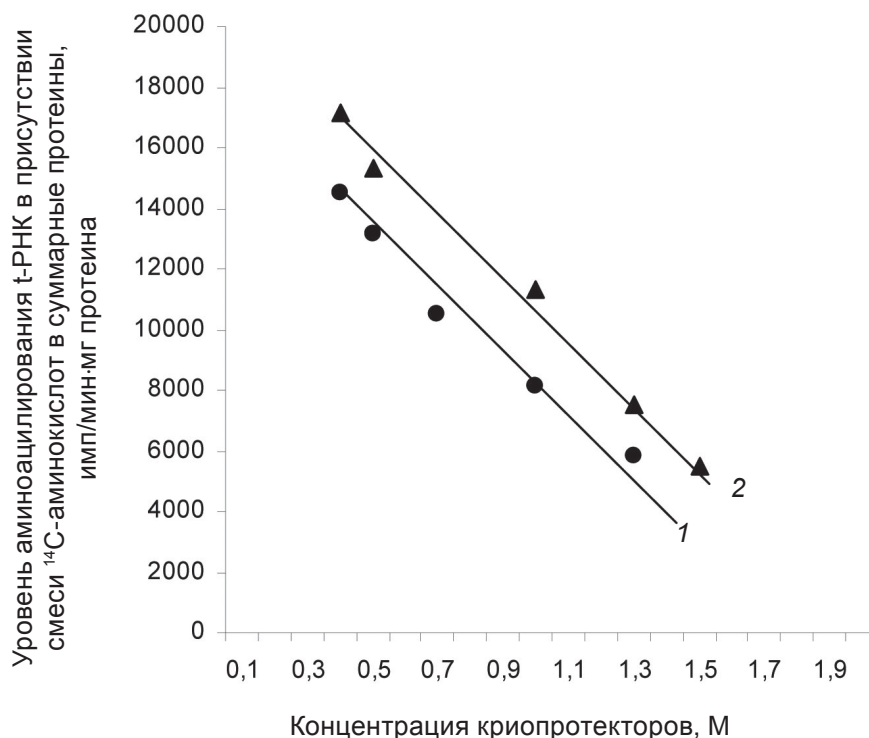


Рис. 4. Влияние концентрации криопротекторов на аминокислотилирование *t*-РНК во фракции S_{15} из печени крыс ($n = 6$): 1 – этиленгликоль, 2 – ДМСО; аминокислотилирование *t*-РНК в контрольном образце (без криопротекторов) составляет 16387 ± 2248 имп/мин·мг протеина

Известно, что каталитическая активность аминоксил-тРНК-синтетаз является Mg^{2+} -зависимой. Ионы магния не только необходимы для образования аминоксиладенилата, но и в случае, например, лейцил-тРНК-синтетазы, сами входят в состав комплекса Leu-АМР-энзим [9]. Не исключено, что в исследуемой нами реакции аминоксилирования криопротекторы способны потенцировать действие Mg^{2+} и ингибировать одну из стадий процесса трансляции.

Несмотря на то, что количество связанной воды в рибосомах относительно невелико и в водной среде рибосомы 80S в функционально активном состоянии представляют собой компактно свернутый рибонуклеопротеидный тяж, при этом внутренняя часть субъединицы рибосомы более гидрофобна, а внешняя – гидрофильна [8]. Известно [1], что криопротекторы способны частично вытеснять и замещать связанную воду в крупных макромолекулах, что является одним из механизмов защитного действия криопротекторов на молекулярном уровне при замораживании биообъектов. В момент такого замещения криопротектор способен стабилизировать структуру молекулы, что, с одной стороны, предохраняет от разрушительных факторов замораживания, а, с другой – приводит к потере функциональной активности (например, энзимов). По-видимому, при повышении концентрации криопротектора в среде увеличивается замещение связанной криопротектором воды, что стабилизирует как протеины, так и РНК, входящие в состав субъединиц и соответственно снижает функциональную активность рибосомы. Описанный эффект является обратимым, при удалении криопротектора из среды молекулы способны возвращать вытесненную криопротектором воду, частично или полностью восстанавливая свои структурно-функциональные свойства. Возможно, более глубокое исследование описанных механизмов сможет пролить свет на объяснение полученных в наших экспериментах данных о повышении уровня синтеза протеинов после удаления ДМСО из фракции S_{15} на 30% по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные данные указывают на способность криопротекторов обратимо ингибировать биосинтез протеинов и реакцию аминоксилирования в бесклеточной системе, что, по-видимому, связано со структурно-функциональным изменением как рибосом, так и энзимов, принимающих участие в синтезе протеинов.

ВПЛИВ ПРОНИКАЮЧИХ КРИОПРОТЕКТОРІВ НА БІОСИНТЕЗ ПРОТЕЇНІВ У БЕЗКЛІТИННІЙ СИСТЕМІ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

О. К. Гулевський, А. Ю. Нікольченко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: lord_n2001@mail.ru

Досліджено вплив концентрації проникаючих криопротекторів й іонів Mg^{2+} на протеїнсинтезуючу активність постмітохондріального супернатанту (S_{15}) із печінки щурів, а також вплив криопротекторів на процес аміноацилювання. Додавання проникаючих криопротекторів – етиленгліколю і ДМСО – призводить у безклітинній системі до концентраційнозалежного оборотного інгібування біосинтезу протеїнів і реакції аміноацилювання. У малих концентраціях зазначені криопротектори потенціюють у безклітинній системі стимулюючий вплив Mg^{2+} на сумарний синтез протеїнів.

Ключові слова: біосинтез протеїнів у безклітинній системі, аміноацилювання, проникаючі криопротектори, іони Mg^{2+} .

THE INFLUENCE OF THE PENETRATING CRYOPROTECTORS ON PROTEIN SYNTHESIS IN THE CELL-FREE SYSTEM OF THE RAT LIVER

A. K. Gulevsky, A. Yu. Nikolchenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov;
e-mail: lord_n2001@mail.ru

Summary

The influence of the penetrating cryoprotector and Mg^{2+} ions on the protein-synthesizing activity of postmitochondrial supernatant of the rat liver as well as on aminoacylation processes has been investigated. The addition of the penetrating cryoprotectors – ethylene glycol and DMSO – resulted in the concentration-dependant reversible inhibition of the protein biosynthesis and aminoacylation reaction in the cell-free system. These cryoprotectors at low concentrations intensified the stimulating effect of Mg^{2+} on the cumulative protein synthesis in the cell-free system.

Key words: protein synthesis in the cell-free system, aminoacylation, penetrating cryoprotectant, ions Mg^{2+} .

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Кробиология. — К.: Наук. думка, 1994. — 431 с.
2. Линник Т. П. // Цитология. — 2004. — 46, № 9. — С. 811–812.
3. Westh P. // Biochem. Biophys. Acta — Biomembranes. — 2004. — 1664, N 2. — P. 217–223.
4. Гулевский А. К. Барьерно-транспортные свойства плазматических мембран в процессе криоконсервирования. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Харьков, 1984. — 18 с.
5. Gulevsky A. K., Grischenkova E. A., Ryazantsev V. V., Belous A. M. // Cryo-Letters. 1990. — 80. — P. 405–412.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe. — Strasbourg, 1986. — 53 p.
7. Угарова Т. Ю. / В кн.: Физико-химические методы в молекулярной биологии. Молекулярная биология. М., ВИНТИ, 1976. — С. 58–141.
8. Спиринов А. С. Структура рибосом и биосинтез белка / Научный центр биологических исследований АН СССР в Пушкине. — 1984. — 367 с.
9. Шапвиль Ф., Энни А. Л. / Биосинтез белка. — М.: Мир, 1977. — 315 с.
10. Марковский А. Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков. — Автореферат. ... дисс. канд. биол. наук. — Харьков, 1984. — 16 с.
11. Spirin A. S., Lishnevskaya E. B. // FEBS Lett. — 1971. — 14. — P. 114–116.

Получено 13.02.2012