

1. *Tobin A. J.* Evaluating the contribution of posttranscriptional processing to differential gene expression // *Develop. Biol.*—1979.—68, N 1.— P. 47—58.
2. *Groudine M., Weintraub H.* Activation of globin genes during chicken development // *Cell.*—1981.—24, N 2.— P. 393—401.
3. *On pre-messenger RNA and transcriptions. A review / K. Scherrer, M.-T. Imaizumi-Scherrer, C.-A. Reynaud, A. Therwath // Mol. Biol. Repts.*—1979.—5, N 1.— P. 5—28.
4. *Harrison P. R.* Molecular analysis of erythropoiesis. A current appraisal // *Exp. Cell Res.*—1984.—155, N 2.— P. 321—344.
5. *Gazaryan K. G.* Genome activity and gene expression in avian erythroid cells // *Int. Rev. Cytol.*—1982.—74.— P. 95—126.
6. *Последовательности, кодирующие глобин, в 28S пре-мРНК и в цитоплазматической РНК эритроидных клеток голубя / К. Г. Газарян, В. И. Дубовая, Н. С. Незнанов и др. // Молекуляр. биология.*—1980.—14, № 4.— С. 766—772.
7. *Tarantul V. Z., Dubovaya V. I., Neznanov N. S.* Globin-coding sequences in nuclear and cytoplasmic RNA of pigeon erythroid cells // IX Int. symp. of structure and function of erythroid cell.—Berlin, 1980.— P. 82.
8. *Moderately repetitive sequences of the pigeon genome transcribed in erythroid cells: transcription assessment and cloning / V. Z. Tarantul, V. A. Goltsov, V. I. Dubovaya et al. // Biomed. et biochim. acta.*—1984.—43, N 1.— P. 48—50.
9. *Тарантул В. З., Газарян К. Г.* Гетерогенная ядерная РНК: структура и функция // *Успехи биол. химии.*—1982.—22.— С. 26—62.
10. *Кавсан В. М.* Неоднозначность границ транскрипции эукариотических генов // *Биополимеры и клетка.*—1987.—3, № 3.— С. 115—127.
11. *Broders F., Scherrer K.* Transcription of the alpha globin gene domain in normal and AEV-transformed chicken erythroblasts: mapping of giant globin-specific RNA including embryonic and adult genes // *Mol. and Gen. Genet.*—1987.—209, N 2.— P. 210—220.
12. *Метаболически стабильные классы ядерной РНК информационного типа / К. Г. Газарян, Е. Д. Кузнецова, И. В. Фетисова, В. З. Тарантул // Молекуляр. биология.*—1979.—13, № 4.— С. 761—768.
13. *Venetianer P., Leder P.* Enzymatic synthesis of solid phase-bound DNA sequences corresponding to specific mammalian genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1974.—71, N 10.— P. 3892—3895.
14. *Reynaud C.-A., Imaizumi-Scherrer M.-T., Scherrer K.* The size of the transcriptional units of the avian globin genes defined at the pre-messenger RNA level // *J. Mol. Biol.*—1980.—140, N 4.— P. 481—505.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 12.01.88

УДК 577.214.43

## ФАКТОР ИНИЦИАЦИИ 3 (IF-3)

### *Escherichia coli* ЯВЛЯЕТСЯ СУБСТРАТОМ

### ДЛЯ ЛЕЙЦИЛ(ФЕНИЛАЛАНИЛ)-тРНК-ПРОТЕИН ТРАНСФЕРАЗЫ\*

Н. В. Белицина

Фактор инициации 3 (IF-3) *E. coli* играет определяющую роль в узнавании мРНК в процессе инициации трансляции [1]. Известны две формы IF-3 (длинная и укороченная) —  $\alpha$  и  $\beta$  [2], или l и s [3]. В препаратах IF-3 в виде миноров встречаются также l-форма без концевой метионина, содержащая лизин с N-конца, и s-форма, которая с N-конца имеет аргинин [4].

Лейцил(фенилаланил)-тРНК-протеин трансфераза *E. coli* (ЕС 2.3.2.6) переносит аминокислотные остатки из аминоацил-тРНК только на те субстраты, которые на N-конце имеют положительно заряженную аминокислоту (аргинин, лизин, гистидин) [5]. Так, в частности, субстратом являются  $\alpha_{s1}$ -казеин и  $\beta$ -казеин. При этом с N-конца полипептид удлиняется на одну аминокислоту: лейцин, фенилаланин или метионин. Фермент использует для этого Лей-тРНК<sup>Leu</sup>, Фен-тРНК<sup>Phe</sup> и элонгаторную Мет-тРНК<sup>Met</sup> [6]. До сих пор в *E. coli* не был идентифицирован белок, который являлся бы субстратом для Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазы.

В настоящей работе приведены данные о перенесении лейцина, фенилаланина и метионина из соответствующих аминоацил-тРНК в IF-3. Из двух его полипептидных

\* Представлена членом редколлегии А. В. Ельской.

цепей (1 и s) только короткая (s) может модифицироваться с участием Лей-(Фен)-тРНК-протеин трансферазы.

Рибосомы, однократно осажденные в ультрацентрифуге, и IF-3 получали из *E. coli* по методу [7, 8]. В опытах использовали коммерческие препараты тотальной тРНК *E. coli* («Boehringer-Mannheim», ФРГ), энзиматически аминокислотированные [<sup>3</sup>H]фенилаланином ([<sup>3</sup>H]Фен, «Amersham», Англия, 370 ГБк/ммоль), [<sup>3</sup>H]лейцином ([<sup>3</sup>H]Лей, «Amersham», Англия, 370 ГБк/ммоль) или [<sup>35</sup>S]метионином ([<sup>35</sup>S]Мет, Ташкент. отд-ние «Изотоп», 990 ГБк/ммоль) [7]. Препарат Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазы выделяли из белков, смываемых с рибосом *E. coli* 1 М NH<sub>4</sub>Cl в 20 мМ трис-

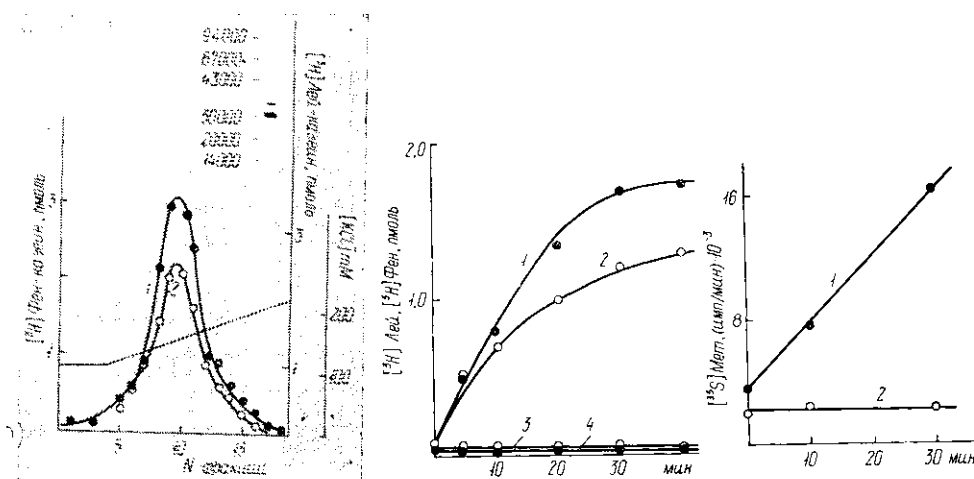


Рис. 1. Профиль элюции Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазы с ДЭАЭ-целлюлозной колонки: включение [<sup>3</sup>H]Фен (1) и [<sup>3</sup>H]Лей (2) в  $\alpha_{s1}$ -казеин. В рамке — флюорограмма после электрофореза инкубационной смеси, содержащей 0,6 мкг  $\alpha_{s1}$ -казеина, ДЭАЭ-целлюлозную фракцию и [<sup>3</sup>H]Фен-тРНК (инкубация 30 мин при 37 °С)

Fig. 1. DEAE-cellulose elution profile of Leu(Phe)-tRNA-protein transferase: [<sup>3</sup>H]Phe (1) and [<sup>3</sup>H]Leu (2) incorporation into  $\alpha_{s1}$ -casein. Insert: gel fluorogram after electrophoresis of the incubation mixture containing 0.6  $\mu$ g of  $\alpha_{s1}$ -casein, the DEAE-cellulose fraction and [<sup>3</sup>H]Phe-tRNA (incubation for 30 min, 37 °C)

Рис. 2. Кинетика включения [<sup>3</sup>H]Лей и [<sup>3</sup>H]Фен в ТХУ-нерастворимый продукт препарата IF-3: 1 — проба объемом 50 мкл содержит 0,3 мкг IF-3, 2 мкг белка препарата Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазы и 20 пмоль [<sup>3</sup>H]Фен-тРНК; 2 — то же, но вместо последнего — 20 пмоль [<sup>3</sup>H]Лей-тРНК; 3 — то же, что 1, без IF-3; 4 — то же, что 2, без IF-3

Fig. 2. Kinetics of [<sup>3</sup>H]Lcu and [<sup>3</sup>H]Phe incorporation into the TCA-insoluble product of IF-3: 1 — 50  $\mu$ l of aliquot contains 0.3  $\mu$ g of IF-3, 2  $\mu$ g of the Leu(Phe)-tRNA-protein transferase and 20 pmol [<sup>3</sup>H]Phe-tRNA; 2 — the same, but instead of the latter — 20 pmol [<sup>3</sup>H]Leu-tRNA; 3 — the same as 1, without IF-3; 4 — the same as 2, without IF-3

Рис. 3. Кинетика включения [<sup>35</sup>S]Мет в ТХУ-нерастворимый продукт препарата IF-3: 1 — проба объемом 100 мкл содержит 2 мкг IF-3, 4 мкг белка препарата Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазы и 80 пмоль [<sup>35</sup>S]Мет-тРНК; 2 — то же без IF-3

Fig. 3. Kinetics of [<sup>35</sup>S]Met incorporation into the TCA insoluble product of IF-3: 1 — 100  $\mu$ l of aliquot contains 2  $\mu$ g of IF-3, 4  $\mu$ g of Leu(Phe)-tRNA-protein transferase and 80 pmol [<sup>35</sup>S]Met-tRNA; 2 — the same 1, without IF-3

HCl-буфере, рН<sub>25°C</sub> 7,4, содержащем 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ и 0,1 мМ ЭДТА. После осаждения рибосом в ультрацентрифуге к надосадочной фракции добавляли (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до конечной концентрации 40 %. Образующийся осадок собирали центрифугированием и растворяли в 20 мМ трис-HCl-буфере, рН<sub>4°C</sub> 8,0, содержащем 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА, 100 мМ KCl и 10 %-ный глицерин, и диализовали против этого буфера. Полученный раствор белков фракционировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (DE-52, «Whatman», Англия) градиентом концентрации KCl в том же буфере. Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазную активность во фракциях элюата с колонки определяли по включению в  $\alpha_{s1}$ -казеин [<sup>3</sup>H]Фен и [<sup>3</sup>H]Лей из соответствующих меченых аминокислот-тРНК. Для этого проба 100 мкл инкубационной смеси содержала 20 мкл фракции с колонки, 0,6 мкг  $\alpha_{s1}$ -казеина и 50 пмоль [<sup>3</sup>H]Фен-тРНК или [<sup>3</sup>H]Лей-тРНК. Инкуба-

цию проводили при 37 °С в 20 мМ трис-НСl-буфере, рН<sub>37</sub> °С 7,6, содержащем 30 мМ КСl, 80 мМ NH<sub>4</sub>Сl, 5 мМ MgСl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА (буфер А). После инкубации пробы гидролизовали 5 %-ной ТХУ в течение 20 мин при 90 °С в присутствии 100 мкг бычьего сывороточного альбумина. Кислотонерастворимый осадок наносили на фильтры GF/C «Whatman» (Англия) и их радиоактивность определяли в стандартном толуольном сцинтиллаторе на счетчике LS-9800 «Beckman» (США).

Как видно из рис. 1, Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазная активность элюируется с ДЭАЭ-целлюлозной колонки в области 140—160 мМ КСl. При этом профили

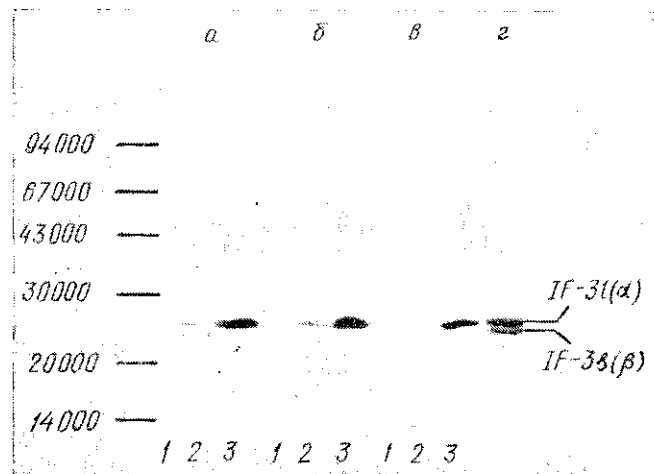


Рис. 4. Флюорограммы гелей после электрофореза инкубационных смесей, содержащих IF-3, Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазу и меченую аминоксил-тРНК: а — [<sup>35</sup>S]Мет-тРНК; б — [<sup>3</sup>H]Фен-тРНК; в — [<sup>3</sup>H]Лей-тРНК (1 — в отсутствие IF-3, 60 мин инкубации при 37 °С; 2 — 1,8 мкг IF-3, 10 мин инкубации при 37 °С; 3 — то же, что 2, 60 мин); г — электрофореграмма препарата IF-3, окраска Кумасси G-250

Fig. 4. Gel fluorograms after electrophoresis of incubation mixtures containing IF-3, Leu(Phe)-tRNA-protein transferase and radioactive aminoacyl-tRNA: а — [<sup>35</sup>S]Met-tRNA; б — [<sup>3</sup>H]Phe-tRNA; в — [<sup>3</sup>H]Leu-tRNA (1 — without IF-3, incubation for 60 min at 37 °С; 2 — 1.8 μg of IF-3, incubation for 10 min at 37 °С; 3 — the same as 2, incubation for 60 min); г — gel electrophoresis of IF-3, stained with Coomassie G-250

включения [<sup>3</sup>H]Фен и [<sup>3</sup>H]Лей в казеин совпадают. Фракции, содержащие эту активность, хранили при —70 °С и использовали в качестве препарата Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазы. На этом же рисунке приведена флюорограмма геля после электрофореза инкубационной смеси, содержащей α<sub>51</sub>-казеин, фракцию с ДЭАЭ-колонки и [<sup>3</sup>H]Фен-тРНК. На флюорограмме видны две полосы, содержащие [<sup>3</sup>H]Фен метку в области 30000, соответствующей молекулярным массам используемого препарата α<sub>51</sub>-казеина.

На рис. 2 и 3 представлены кинетики включения [<sup>3</sup>H]Фен, [<sup>3</sup>H]Лей и [<sup>35</sup>S]Мет из соответствующих аминоксил-тРНК в препарат IF-3 в буфере А. Из кривых видно, что накопление ТХУ-негидролизованного радиоактивного продукта полностью определяется наличием фактора инициации в инкубационной смеси. Кинетическое плато переноса лейцина и фенилаланина наступает приблизительно через 30 мин инкубации при 37 °С. Скорости включения этих аминоксил близки. Расчет показывает, что 15 пмоль IF-3 включают около 1,5 пмоля лейцина или фенилаланина на кинетическом плато. Включение [<sup>35</sup>S]Мет за 30 мин инкубации не достигает кинетического плато, что связано, по-видимому, с небольшим содержанием метиониновой элонгаторной тРНК в препарате тотальной тРНК.

Электрофорез белков проводили по методу [9] в градиенте концентрации полиакриламида 10—20 % в присутствии 0,1 %-ного DS-Na. Для флюорографии гели после электрофореза обрабатывали реагентом Amplifay («Amersham», Англия), высушивали и экспонировали при —70 °С с пленкой Kodak XR-Omat.

На рис. 4 представлены флюорограммы гелей после электрофорезов инкубационных смесей, в которых происходило включение меченых аминоксил в препараты IF-3. Сопоставление флюорограмм меченых препаратов IF-3 с окраской Кумасси тех же препаратов показало, что метится всегда только одна цепь IF-3, а именно ее короткая

форма (s). Мечения l-формы IF-3 никогда не наблюдается. Других каких-либо меченых полипептидов помимо IF-3 в геле не обнаруживается.

Итак, в настоящее время можно описать пять разных форм IF-3s, которые отличаются друг от друга N-концевой аминокислотой. Формы IF-3s с концевым валином или аргинином являются продуктом ограниченного протеолиза IF-3l [4]. Концевой лейцин, фенилаланин или метионин — это результат последующей модификации IF-3s, определяемый Лей(Фен)-тРНК-протеин трансферазой. Остается открытым вопрос, что определяет специфичность переноса аминокислотного остатка из аминоацил-тРНК. Есть основания полагать, что специфичность определяется структурой полинуклеотида, в частности структурой мРНК, с которой взаимодействует IF-3. До сих пор не ясна роль короткой формы IF-3 в клетке и даже в инициации трансляции, тем более непонятно значение замены N-концевой аминокислоты. Возможно, что данная замена существенна в узнавании модифицированного полипептида протеазами [10].

Автор искренне благодарит И. Н. Шатского за предоставление препарата IF-3, сотрудников Ин-та белка АН СССР О. Н. Денисенко и В. А. Колба — за помощь в проведении форезов и флюорограмм, а также Е. Р. Арутюнян — за постоянную техническую помощь; Бражникова Е. В. — за предоставление препарата  $\alpha_{s1}$ -казеина.

#### INITIATION FACTOR 3 (IF-3) OF *ESCHERICHIA COLI* IS A SUBSTRATE FOR LEU(PHE)-tRNA-PROTEIN TRANSFERASE

N. V. Belitsina

A. N. Bakh Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

#### Summary

Initiation factor 3 (IF-3) of *Escherichia coli* is a substrate for Leu(Phe)-tRNA-protein transferase (EC 2.3.2.6). Of the two polypeptide chains, only the short one ( $\beta$  or s) can be modified by the attachment of leucine, phenylalanine or methionine to the N-terminal amino acid residue of the chain.

1. Grunberg-Manago M., Gros F. Initiation mechanism of protein synthesis // Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.—1977.—20.—P. 209—284.
2. Lee-Huang S., Ochoa S. Purification and properties of 2 messenger-discriminating species of *E. coli* initiation factor 3 // Arch. Biochem. and Biophys.—1973.—156, N 1.—P. 84—96.
3. Suryanarayana T., Subramanian A. R. Separation of two forms of IF-3 in *Escherichia coli* by two-dimensional gel electrophoresis // FEBS Lett.—1977.—79, N 2.—P. 264—268.
4. Brauer D., Wittmann-Liebold B. The primary structure of the initiation factor IF-3 from *Escherichia coli* // Ibid.—P. 269—275.
5. Leibowitz M. J., Soffer R. L. Enzymatic modification of proteins. 7. Substrate specificity of leucyl, phenylalanyl transfer ribonucleic acid protein transferase // J. Biol. Chem.—1971.—246, N 17.—P. 5207—5212.
6. Soffer R. L. Post-translational modification of proteins catalyzed by aminoacyl-tRNA protein transferases // Mol. and Cell. Biochem.—1973.—2, N 1.—P. 3—14.
7. Гаврилова Л. П., Смолянинов В. В. Изучение механизма транслкации в рибосомах. 1. Синтез полифенилаланина в рибосомах *Escherichia coli* без участия гуанозин-5'-трифосфата и белковых факторов трансляции // Молекуляр. биология.—1971.—5, № 6.—С. 883—891.
8. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors IF1, IF2 and IF3 from *E. coli* // J. W. B. Hershey, J. Vanov, K. Johnston, J. L. Fakunding // Arch. Biochem. and Biophys.—1977.—182, N 2.—P. 626—638.
9. Laemmli V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.
10. Bachmair A., Finley D., Varshavsky A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue // Science.—1986.—234, N 4773.—P. 179—186.

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Получено 15.03.88