

Дослідження комплексів фактора елонгації 1A з тРНК^{Ser} та серил-тРНК синтетазою

П. В. Футерник, А. П. Погрібна, З. М. Петрушенко, Б. С. Негруцький,
Г. В. Єльська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
p.v.futernyk@imbg.org.ua

Для визначення механізму каналювання тРНК досліджено формування неканонічних комплексів фактора елонгації 1A1 з деацильованою тРНК^{Ser} та серил-тРНК синтетазою методом затримки смуги в поліакриламідному гелі. Оцінено стабільність комплексів. Перевірено можливість формування неканонічного комплексу тРНК з тканинспецифічною ізоформою фактора елонгації 1A2 і показано, що такий комплекс має більшу стабільність, ніж аналогічний комплекс з eEF1A1. Результати досліджень є ще одним підтвердженням запропонованого раніше механізму каналювання тРНК у циклі елонгації білкового синтезу в клітинах ссавців.

Вступ. Характерною особливістю апарату білкового синтезу вищих еукаріотів є високий рівень структурної організації, що забезпечує його ефективне функціонування [1]. Власне просторова і функціональна компартменталізація всіх компонентів, які беруть участь у послідовних біохімічних реакціях на цьому метаболічному шляху, може дозволити значно підвищити ефективність трансляції та уникнути неспецифічних впливів інших метаболічних процесів, що відбуваються в еукаріотній клітині, зокрема, конкуренції за субстрати, які використовуються в багатьох процесах одночасно (АТР, ГТР, амінокислоти).

Одним із механізмів, який може реалізувати потенційні переваги компартменталізації, є каналювання (channeling) [2], яке передбачає пряме перенесення («з рук у руки») аміноацил-тРНК від місця синтезу (аміноацил-тРНК синтетаза) до місця використання (рибосома) і назад, без дисоціації у цитоплазму. Каналювання під час білкового синтезу було підтверджено в умовах *in vivo* [3], але молекулярних механізмів цього явища визначено не було.

Найменш вивченим моментом у схемі каналю-

вання тРНК в процесі трансляції залишається шлях між Е сайтом елонгуючої рибосоми та аміноацил-тРНК синтетазою (АРСазою).

Раніше нами виявлено, що еукаріотний фактор елонгації eEF1A у GDP-формі стимулює активність фенілаланіл-тРНК синтетази (PheRS) [4]. Було зроблено припущення, що eEF1A, який знаходиться у GDP-формі після гідролізу GTP при взаємодії аміноацил-тРНК з рибосомою, здатний зв'язувати деацильовану тРНК, дисоціювати разом з рибосоми у вигляді неканонічного потрійного комплексу eEF1A·GDP·тРНК та переносити тРНК на АРСазу [5]. У цьому випадку виявлена стимуляція перших стадій синтезу аміноацил-тРНК GDP-формою eEF1A може відображати взаємодію даного комплексу з АРСазою.

Дійсно, нещодавно доведено існування неканонічних комплексів тРНК^{Phe}·eEF1A·GDP [6] та PheRS·тРНК^{Phe}·eEF1A·GDP [7]. Виявлення цих комплексів свідчить на користь запропонованої схеми каналювання тРНК. Але якщо врахувати існування в клітині 20 різних АРСаз, то не можна виключити, що формування подібних неканонічних комплексів є специфічним тільки для PheRS, тобто воно може не віддзеркалювати загального механізму каналювання тРНК в клітині.

Саме тому ми визнали за необхідне розширити

спектр досліджуваних АРСаз. У цій роботі вивчали можливість формування неканонічних комплексів eEF1A·GDP з тРНК^{Ser} та серил-тРНК синтетазою (SerRS).

Матеріали і методи. У роботі використано АТФ, GTP, GDP, CTP, N,N-метиленбісакриламід, трис, HEPES, додецилсульфат натрію (SDS) фірми «Calbiochem» (США); β-меркаптоетанол, гліцерин, NH₄Cl, MgCl₂ («Merck», Німеччина); акриламід (двічі перекристалізований), TEMED, ФМСФ, ДТТ, ЕДТА («Serva», Німеччина); фільтри GF/C («Whatman», Велика Британія); персульфат натрію, бромфеноловий синій, кумасі R-250 («Bio-Rad», США); сцинтиляційна рідина «OptiPhase Hi-Safe» («Sed», Велика Британія); фосфодіестераза зміїної отрути (PDEI Type IV з *Crotalus atrox* venom) («Sigma», США); [α-³²P]АТФ, U-¹⁴C-L-серин, [³H]GDP («Amersham», Велика Британія). Решта реактивів з маркою «ч. д. а.» або «о. с. ч.»

Препарати сумарної тРНК з печінки бика отримували, використовуючи пряму депротейнізацію гомогенату тканини фенолом з наступною хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі [8]. Препарати тРНК^{Ser} отримували з сумарної тРНК печінки бика за схемою, яка передбачала хроматографію на ВD-целюлозі та в системі HPLC Gold на колонках Spherogel-TSK DEAE 5PW, C3 RPSC 5u Ultrapore та Hypersil 5C4 («Beckman», США).

Препарат фактора елонгації eEF1A1 очищено із гомогенату печінки кроля. Тканину подрібнювали і промивали буфером (трис-НСІ, рН 7,6, 1 мМ ФМСФ, 2 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 15 %-й гліцерин). Далі печінку гомогенізували протягом 30 с в гомогенізаторі РТ-1 з перервою у 20—30 с для запобігання нагріванню. Процедура гомогенізації повторювали кілька разів до отримання гомогенної маси. Гомогенат центрифугували при 10000 об/хв, протягом 1 год при температурі 4 °С на низькошвидкісній центрифугі, потім супернатант фільтрували через чотири шари стерильної марлі.

Постмітохондріальний супернатант наносили на колонку з Сефакрилом S-400 («Pharmacia», Швеція) і промивали буфером А (30 мМ КН₂РО₄, рН 7,5, 1 мМ MgCl₂, 15 %-й гліцерин, 6 мМ 2-меркаптоетанол). Після гель-фільтрації фракції з eEF1A об'єднували і наносили на колонку з ДЕАЕ-целюлозою («Whatman»), а освітлений екстракт наносили на колонку з SP-сефарозою («Pharmacia»). Білок елюювали градієнтом концентрації КСІ (від 50 до 350 мМ) у буфері А. Фракції, що містили eEF1A, об'єднували і наносили на колонку з гідроксіапатитом («Bio-Rad»). Білок елюювали за допомогою лінійного градієнта від 40 до 220 мМ

КН₂РО₄ в буфері А, фракції, які містили eEF1A, об'єднували і діалізували протягом ночі проти буфера А. Білок концентрували за допомогою SP-сефарози. Розчин eEF1A зберігали в буфері у рідкому азоті (25 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 25 мМ КСІ, 2 мМ MgCl₂, 25 %-й гліцерин, 6 мМ 2-меркаптоетанол). На всіх етапах очищення eEF1A фактор визначили за реакцією GTP/[³H]GDP обміну [9]. Концентрацію білка вимірювали з використанням методу Бредфорд [10].

Препарати тканинспецифічної ізоформи фактора елонгації eEF1A2 отримували з м'язів кроля, як і eEF1A1, але з додатковим етапом очищення. Після хроматографії на гідроксіапатиті фракції, що містили eEF1A2, об'єднували і наносили на колонку з фосфоцелюлозою Р11 («Whatman»); білок з колонки елюювали за допомогою лінійного градієнта концентрації КСІ (від 30 до 500 мМ).

Препарати SerRS одержували з печінки бика, як описано [11] з невеликими модифікаціями. Всі процедури здійснювали при температурі 4 °С. Печінку (загальною масою 150—170 г) витягали після забою тварин з наступною негайною гомогенізацією тканини у двох об'ємах буфера, який містив 50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 10 %-й гліцерин, 0,2 мМ ЕДТА, 5 мМ Mg(CH₃COO)₂, 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ.

Гомогенат осаджували з 5 до 10 % ПЕГ-6000 (поліетиленгліколь) упродовж 20 хв і центрифугували при 8000 об/хв. До супернатанту додавали ПЕГ до 50 % і центрифугували. Осад розчиняли (об'єм 120 мл) і наносили на колонку з Q-сефарозою (об'єм 70 мл). Білок елюювали в лінійному градієнті 0,01—0,2 М К-фосфату, рН 7,5, що містив 10 %-й гліцерин, 0,5 мМ ЕДТА, 0,5 мМ ДТТ. Активність SerRS визначали в реакції аміноацилювання тРНК. Фракції, які містили серил-тРНК синтетазну активність, об'єднували та розводили в 5 разів буфером Б: 20 мМ К-фосфат, рН 7,5, що містив 10 % гліцерину, 0,5 мМ ЕДТА, 0,5 мМ ДТТ.

Об'єднані фракції наносили на колонку з фосфоцелюлозою Р-11 (об'єм 50 мл). SerRS елюювали в лінійному градієнті 20—300 мМ К-фосфатного буфера. Фракції, що містили активність SerRS, об'єднували, розводили в 5 разів буфером Б і наносили на колонку об'ємом 15 мл з S-сефарозою. Змивали в тому ж буфері у лінійному градієнті концентрації 0—0,3 М КСІ. Об'єднували фракції з активністю SerRS та діалізували проти 600 мл 20 мМ трис-НСІ, рН 7,5, що містив 10 %-й гліцерин, 0,5 мМ ДТТ, 0,2 мМ ЕДТА, 0,1 мМ ФМСФ, 5 мМ MgCl₂.

Наступний етап — хроматографія на колонці з

гепарин-сефарозою об'ємом 1 мл. Елюцію білка проводили в лінійному градієнті концентрації від 0 до 0,35 М КСl у 20 мМ трис-НСl, рН 7,5. Фракції, які містили активність SerRS, об'єднували та діалізували проти буфера, що містив 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 20 %-й гліцерин, 0,5 мМ ДТТ, 0,2 мМ ЕДТА, 0,1 мМ ФМСФ, 5 мМ MgCl₂. Препарати заморожували та зберігали в рідкому азоті.

Потім білок концентрували на гепарин-сефарозі (об'єм колонки 0,5 мл, буфер містив 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 %-й гліцерин, 0,5 мМ ДТТ, 0,2 мМ ЕДТА, 0,1 мМ ФМСФ, 5 мМ MgCl₂), білок елюювали 0,4 М КСl і діалізували його проти буфера, який містив 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 20 %-й гліцерин, 0,5 мМ ДТТ, 0,2 мМ ЕДТА, 0,1 мМ ФМСФ, 5 мМ MgCl₂. Концентрацію білка реестрували за методом Бредфорд [10].

Чистоту серил-тРНК синтетази визначали методом електрофорезу в 12 %-му ПААГ у денатуруючих умовах, чистота препарату складала 85 %.

Активність SerRS виявляли за початковою швидкістю реакції аміноацилювання тРНК. Стандартна інкубаційна суміш у 100 мкл вміщувала такі кінцеві концентрації: 20 мМ імідазол-НСl, рН 7,5, 150 мМ КСl, 0,5 мМ ДТТ, 10 мМ MgCl₂, 3 мМ АТР, 1 мг/мл БСА, 60 мкМ [¹⁴C]серин (50 Ки/моль), надлишкові кількості (100—250 мкг) сумарної тРНК з печінки кроля, 3 нМ SerRS. Інкубацію проводили протягом 10 хв при 25 °С і зупиняли додаванням 2 мл охолодженого розчину 5 %-ї ТХО. Осад формували упродовж 10 хв на крижаній бані, потім наносили на фільтри GF/C («Whatman») і промивали 30 мл охолодженої 5 %-ї ТХО. Фільтри висушували, вміст радіоактивності визначали в толуоловому сцинтиляторі «OptiPhase» на лічильнику RackBeta 1219 («LKB-Wallac»). Ефективність обрахунку ізотопу [¹⁴C] на фільтрах складала 95 %.

Попереднє відщеплення ССА-кінця молекул тРНК проводили у 50 мкл 50 мМ трис-НСl, рН 8,2, що містив 10 мМ MgCl₂, в присутності 1 од. акт. фосфодіестерази зміїної отрути. Інкубували протягом 15 хв при кімнатній температурі, після чого реакцію зупиняли додаванням 50 мкл водонасиченого фенолу. Розчин перемішували (2 хв) на швидкісному шутелі, потім центрифугували при 11000 об/хв протягом 3 хв. Відбирали водну фазу, в яку додавали 5 мкл 3 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0, та 200 мкл етанолу для осадження тРНК. Розчин охолоджували при -20 °С (1 год) та центрифугували при 11000 об/хв протягом 5 хв.

тРНК мітили у 20 мкл 50 мМ трис-НСl, рН 8,3, що містив 10 мМ БК [α -³²P]АТР, 10 мМ MgCl₂, 8 мМ ДТТ, 1,5 мкг СТР, 5 мкг індивідуальної

тРНК, 10 од. акт. тРНК-нуклеотидилтрансферази, протягом 45 хв при 37 °С. Потім мічену тРНК очищували у 8 %-му ПААГ (співвідношення акриламід до N,N-метиленабісакриламід 19:1) з 7 М сечовиною. Склад електродного буфера: 50 мМ трис-борат, рН 8,3, 1 мМ ЕДТА.

Локалізацію в гелі радіоактивної тРНК визначали авторадіографічно. Елюцію міченої тРНК з гелю проводили у 100 мкл 0,5 М амоній-ацетатного буфера, рН 6,0, 1 мМ ЕДТА, 0,1 % SDS протягом 45 хв.

тРНК з гелю елюювали послідовно три рази, далі її осаджували трьома об'ємами спирту з 0,3 М Na-ацетатним буфером, рН 5,0, у присутності 1 мМ ЕДТА. Отриманий осад [³²P]тРНК висушували та використовували в подальшій роботі.

Формування комплексів білків і тРНК проводили в буфері, що містив 20 мМ HEPES, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ КСl, 10 %-й гліцерин, 2 мМ ДТТ, який інкубували протягом 15 хв при 37 °С та наносили на 5 %-й ПААГ (без денатуруючих агентів) (співвідношення акриламід:N,N-метиленабісакриламід 1:39), що вміщував 25 мМ трис-борат, рН 7,5, 0,5 мМ ЕДТА, 5 %-й гліцерин. Для підтримання eEF1A у GDP-зв'язаній формі в інкубаційну суміш додавали 0,2 мМ GDP.

У більшості експериментів електрофорез проводили на пластинках 5 %-го ПААГ розміром (0,1 × 10 × 7,5 см), на одну доріжку наносили 10 мкл суміші. В окремих випадках електрофорез було проведено на пластинках (0,1 × 15 × 15 см) і на одну доріжку наносили 20 мкл суміші. Електродний буфер використовували такий же, як у гелі. Час протікання електрофорезу складав 1—2 год, напруження — 100 В.

Радіоавтографію гелю здійснювали при -20 °С протягом двох—трьох діб з використанням рентгенівської плівки BioMax («Кодак»).

Результати і обговорення. Утворення неканонічних потрійного eEF1A·GDP·тРНК^{Ser} та четвертинного eEF1A·GDP·тРНК^{Ser}·SerRS комплексів вивчали за допомогою методу затримки смуги у ПААГ в умовах, при яких тРНК та білки не денатурують. Авторадіограму гелю типового експерименту наведено на рис. 1, а. На першій доріжці — вільна [³²P]тРНК^{Ser}, на другій спостерігається зсув смуги тРНК у верхню частину гелю внаслідок утворення комплексу [³²P]тРНК^{Ser}·eEF1A·GDP. Третя доріжка ілюструє утворення комплексу SerRS з [³²P]тРНК^{Ser}. Утворення четвертинного комплексу [³²P]тРНК^{Ser}·eEF1A·GDP·SerRS, тобто затримка смуги [³²P]тРНК^{Ser} порівняно з попередньою доріжкою, можна спостерігати на четвертій доріжці.

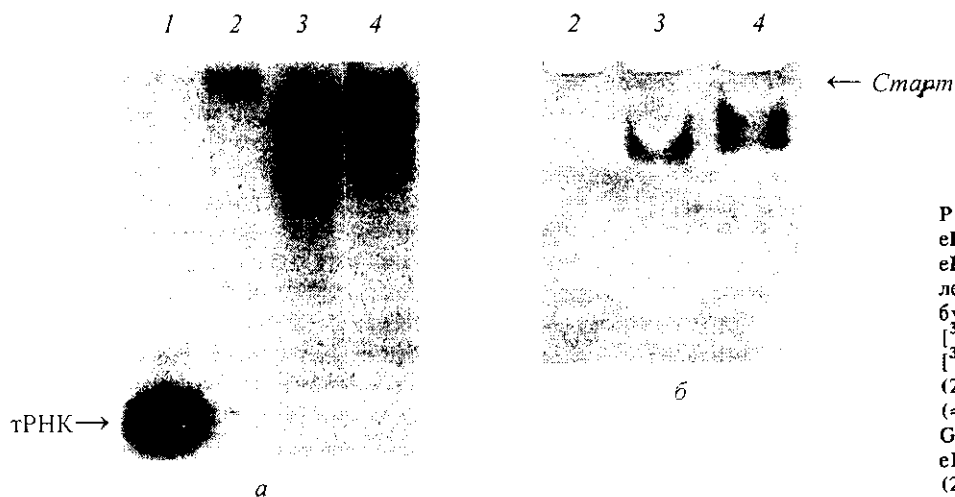


Рис. 1. Формування потрійного $eEF1A \cdot tRNA^{Ser} \cdot GDP$ та четвертинного $eEF1A \cdot GDP \cdot tRNA^{Ser} \cdot SerRS$ комплексів: а — радіоавтографія; б — фарбування Кумасі R-250 (1 — $[^{32}P]tRNA^{Ser}$ (≈ 2 пмоль); 2 — $[^{32}P]tRNA^{Ser}$ (≈ 2 пмоль) + $eEF1A$ (20 пмоль) + GDP ; 3 — $[^{32}P]tRNA^{Ser}$ (≈ 2 пмоль) + $SerRS$ (20 пмоль) + GDP ; 4 — $[^{32}P]tRNA^{Ser}$ (≈ 2 пмоль) + $eEF1A$ (20 пмоль) + GDP + $SerRS$ (20 пмоль)

Для спостереження зміни рухливості в гелі $SerRS$ той самий гель фарбували Кумасі R-250. Із представлених на рис. 1, б, даних видно різницю в рухливості $SerRS$, яка знаходиться в комплексі з $tRNA$ та $eEF1A$. Спостерігається затримка білкової смуги за присутності $eEF1A$. Отже, при інкубації $eEF1A \cdot GDP$ з $SerRS$ та $tRNA^{Ser}$ відбувається уповільнення рухливості в гелі як $tRNA$ (рис. 1, а), так і білків (рис. 1, б), що свідчить про утворення четвертинного комплексу. Фактор елонгації дуже повільно входить у ПААГ при рН 7,5 через високе значення ізоелектричної точки (9,1) (рис. 1, б), тому формування комплексу $eEF1A \cdot tRNA^{Ser}$ сповільнює вхід $tRNA$ до гелю. Отже, загальна кількість $[^{32}P]tRNA$ в гелі у присутності $eEF1A$ значно менша, ніж без нього.

Важливим було оцінити стабільність усіх досліджуваних комплексів. Метод затримки смуги в гелі досить часто використовується і для оцінки стабільності макромолекулярних комплексів [12]. Для цього вивчають вплив на формування комплексу різних концентрацій одного з його компонентів. На рис. 2, а, представлено залежність формування комплексу $eEF1A \cdot GDP \cdot [^{32}P]tRNA^{Ser}$ від концентрації $eEF1A$.

Як уже згадувалося, $eEF1A$ завдяки позитивному заряду молекули входить до гелю при рН 7,5 дуже повільно, що, в свою чергу, призводить до неповного входження до гелю радіоактивно міченої $tRNA$, яка перебуває в комплексі з фактором. Тому було доцільним виявити утворення потрійного комплексу за зменшенням у гелі інтенсивності смуги вільної $[^{32}P]tRNA$, що відбувається завдяки формуванню комплексу $eEF1A \cdot GDP \cdot tRNA^{Ser}$. Час електрофорезу в такому експерименті було зменшено у порівнянні із вказаним на рис. 2, а. З цього рисунку видно, що значення уявної константи

дисоціації (K_d) комплексу $eEF1A \cdot GDP \cdot tRNA^{Ser}$ лежить в інтервалі 250—500 нМ.

Утворення комплексу $tRNA^{Ser} \cdot SerRS$ залежно від концентрації $SerRS$ представлено на рис. 2, б. У цьому випадку комплекс має K_d приблизно 300—400 нМ.

На жаль, оцінити K_d для четвертинного комплексу $tRNA^{Ser} \cdot eEF1A \cdot GDP \cdot SerRS$ (рис. 2, в) цим методом виявилося неможливим, оскільки формування четвертинного комплексу може маскуватися при одночасному нанесенні двох компонентів, які окремо здатні формувати комплекси з $tRNA$ (рис. 2, а, б).

У деяких тканинах організму, зокрема, у м'язовій та нервовій, існує тканиноспецифічна ізоформа фактора елонгації 1А — $eEF1A2$. Поява такої ізоформи може бути обумовлена, серед іншого, особливостями білкового синтезу та каналювання $tRNA$ під час трансляції в термінально диференційованих клітинах. Таким чином, важливо встановити, чи зберігає $eEF1A2$ здатність формувати важливі для каналювання комплекси з $tRNA$, зокрема з $tRNA^{Ser}$. На рис. 3 наведено результати титрування $tRNA^{Ser}$ різними формами $eEF1A$. Цікаво, що уявна константа дисоціації комплексу $eEF1A2 \cdot GDP \cdot tRNA^{Ser}$ (інтервал 80—125 нМ) є навіть нижчою, ніж аналогічна константа комплексу $eEF1A1 \cdot GDP \cdot tRNA^{Ser}$ (інтервал 250—500 нМ), тобто тканиноспецифічна форма фактора елонгації $eEF1A2$ формує з $tRNA$ стабільніший комплекс, ніж широко розповсюджена форма $eEF1A1$. Особливості функціонування $eEF1A1$ і $eEF1A2$ в системі каналюваної трансляції буде детальніше вивчено в подальших дослідженнях.

Результати наших експериментів є ще одним свідченням на користь існування запропонованого раніше механізму каналювання $tRNA$ /аміноацил-

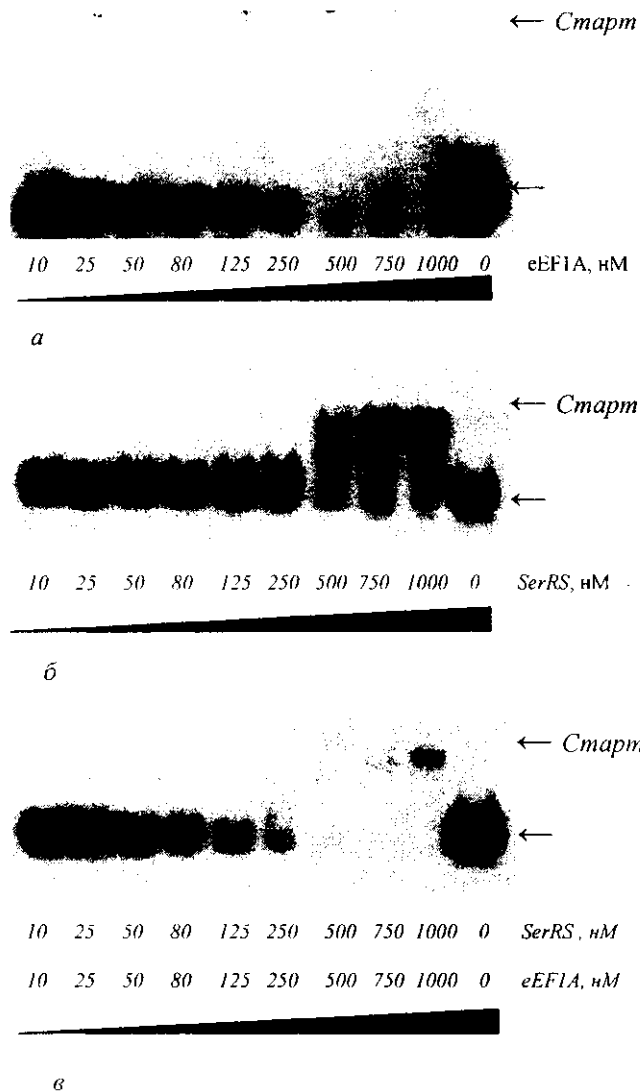


Рис. 2. Концентраційні залежності формування комплексів SerRS та eEF1A з тРНК^{Ser}: *a* — eEF1A + ГДФ + [³²P]тРНК^{Ser}; *б* — SerRS + [³²P]тРНК^{Ser}; *в* — SerRS + eEF1A + GDP + [³²P]тРНК^{Ser}. Кількість [³²P]тРНК^{Ser} у кожній доріжці ≈ 1 пмоль

тРНК у циклі елонгації білкового синтезу в клітинах ссавців. Цей механізм припускає пряме перенесення аміноацил-тРНК від аміноацил-тРНК синтетази до фактора елонгації 1А, який доставляє аміноацил-тРНК до рибосоми, та пряме перенесення деацильованої тРНК у комплексі з фактором елонгації від рибосоми до аміноацил-тРНК синтетази. Безпосереднє перенесення тРНК, наприклад тРНК^{Ser}, може відбуватися в складі потрійного комплексу з eEF1A та GDP, детекція якого була одним з головних завдань даної роботи. Формування потрійного комплексу було зафіксовано по зсуву

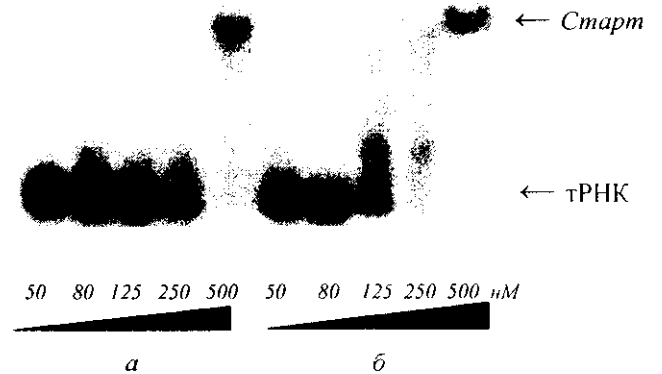


Рис. 3. Порівняння афінності комплексів eEF1A1·GDP та eEF1A2·GDP з [³²P]тРНК^{Ser}. Кількість [³²P]тРНК^{Ser} у кожній доріжці ≈ 1 пмоль: *a* — eEF1A1; *б* — eEF1A2

смуги міченої [³²P] тРНК^{Ser} у комплексі з eEF1A·GDP (рис. 1, *a*).

На відміну від eEF1A1·GDP·тРНК^{Phe} ($K_d = 20$ нМ) [6], взаємодія комплексу eEF1A1·GDP з тРНК^{Ser} не дуже сильна ($K_d = 250$ —500 нМ). Частину цієї різниці можна пояснити тим, що K_d двох комплексів вивчалася двома різними методами — рівноважним методом стаціонарної флуоресцентної поляризації для комплексу eEF1A1·GDP·тРНК^{Phe} і не ідеально рівноважним методом затримки смуги в гелі для eEF1A1·GDP·тРНК^{Ser}. Але беручи до уваги те, що значення K_d комплексу тРНК^{Ser} з другою ізоформою фактора елонгації eEF1A2 (80—125 нМ), також отримане методом затримки смуги в гелі, є більш наближеним до K_d комплексу eEF1A1·GDP·тРНК^{Phe}, можна припустити, що невелика стабільність eEF1A1·GDP·тРНК^{Ser} не є методичним артефактом. На користь цього свідчать і літературні дані про те, що стабільність канонічних комплексів eEF1A1·GDP·аміноацил-тРНК дуже відрізняється в залежності від специфічності тРНК [13]. У наступних дослідженнях планується дослідити взаємодію eEF1A1·GDP з деацильованими тРНК інших специфічностей.

Факт більшої стабільності комплексу з тРНК^{Ser} другої ізоформи фактора елонгації eEF1A2 у порівнянні з eEF1A1 виявився досить цікавим. Можна припустити, що зміна стабільності потрійного комплексу eEF1A·GDP·тРНК впливає на ефективність каналювання, тобто на біосинтез білка в м'язових та нервових клітинах.

Для здійснення каналювання тРНК необхідна взаємодія комплексу eEF1A1·GDP·тРНК з APCазою. Принципову можливість формування такого четвертинного комплексу було показано нами раніше на прикладі фенілаланіл-тРНК синтетази (PheRS) [7]. У цій роботі методом затримки смуги в гелі доведено формування аналогічного комплексу

су для SerRS. Цей комплекс було зафіксовано як радіоавтографічно (візуалізація [^{32}P]тРНК^{Ser}), так і при фарбуванні гелю Кумасі R-250 (візуалізація білків). Важливо, що на відміну від значної стабільності комплексу eEF1A1·GDP·тРНК^{Phe}·PheRS ($K_d = 9$ нМ) [7] взаємодія SerRS із потрійним комплексом eEF1A1·GDP·тРНК^{Ser} є досить слабкою (уявна K_d не нижча від 250 нМ). Таку різницю можна пояснити як використанням різних методів вимірювання K_d , так і великою спорідненістю PheRS з eEF1A1·GDP (K_d білково-білкового комплексу 21 нМ [7]).

Цікаво, що, незважаючи на різні абсолютні значення K_d для комплексів різних тРНК, стабільність комплексу eEF1A1·GDP·тРНК незначно відрізняється від стабільності четвертинного комплексу eEF1A1·GDP·тРНК·АРСаза для тієї ж самої тРНК. Можливо, така невелика різниця необхідна для полегшення процесів асоціації і дисоціації тРНК під час формування і розпаду подібних комплексів.

На сьогодні відома низка взаємодій багатоконпонентного фактора елонгації 1 (eEF1H) з різними АРСазами. Так, у дигібридній системі дріжджів показано можливість взаємодії субодиниць eEF1H з дев'ятьма АРСазами та двома компонентами мультисинтетазного комплексу, які є білками несинтетазної природи [14]. Показано фізичну та/або функціональну взаємодію субодиниць eEF1H *in vitro* з фенілаланіл- [4, 7], аспарагіл- [15, 16], валіл- [17—21] та цистеїніл- [22] тРНК синтетазми. Таким чином, завдяки взаємодії субодиниць eEF1H з різними АРСазами може формуватися певна система функціональних зв'язків, у якій фактор елонгації відіграє ключову роль, що забезпечує як фізичну співкомпартменталізацію АРСаз і eEF1H, так і каналування тРНК між рибосомами та АРСазами під час білкового синтезу.

Автори статті щиро дякують О. Й. Гудзері за допомогу в очищенні серил-тРНК синтетази.

P. V. Futernyk, A. P. Pogribna, Z. M. Petrushenko, B. S. Negrutskii, G. V. El'skaya

Investigation of the complexes of elongation factor 1A with tRNA^{Ser} and seryl-tRNA synthetase

Summary

To investigate the mechanism of tRNA channeling the formation of non-canonical complexes of elongation factor 1A1 with deacylated tRNA^{Ser} and seryl-tRNA synthetase was studied using band shift assay. The stability of these complexes was estimated. The formation of non-canonical complex of tRNA with the tissue-specific isoform of elongation factor 1A2 was examined and found to be more stable than the analogous complex with eEF1A1. Our results are in accordance with the proposed earlier mechanism of tRNA channeling during the elongation cycle of protein biosynthesis.

П. В. Футерник, А. П. Погребная, З. М. Петрушенко, Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Исследование комплексов фактора элонгации 1A с тРНК^{Ser} и серил-тРНК синтетазой

Резюме

Для выяснения механизма каналирования тРНК исследовано формирование неканонических комплексов фактора элонгации 1A1 с деацелированной тРНК^{Ser} и серил-тРНК синтетазой методом задержки полосы в полиакриламидном геле. Оценена стабильность комплексов. Проверена возможность формирования неканонического комплекса тРНК с тканеспецифичной изоформой фактора элонгации 1A2 и показано, что такой комплекс имеет большую стабильность, чем аналогичный комплекс с eEF1A1. Результаты исследований являются еще одним подтверждением предложенного ранее механизма каналирования тРНК в цикле элонгации белкового синтеза.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Ryazanov A. G., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S. Development of structural organization of protein-synthesizing machinery from prokaryotes to eukaryotes // *Biosystems*.—1987.—20.—P. 275—288.
- Ovadi J. Physiological significance of metabolite channeling // *J. Theor. Biol.*—1991.—152.—P. 1—22.
- Negrutskii B. S., Deutscher M. P. Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1991.—88.—P. 4991—4995.
- Negrutskii B. S., Budkevich T. V., Shalak V. F., Turkovskaya G. V., El'skaya A. V. Rabbit translation elongation factor 1 α stimulates the activity of homologous aminoacyl-tRNA synthetase // *FEBS Lett.*—1996.—382.—P. 18—20.
- Stapulionis R., Deutscher M. P. A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1995.—92.—P. 7158—7161.
- Petrushenko Z. M., Negrutskii B. S., Ladokhin A. S., Budkevich T. V., Shalak V. F., El'skaya A. V. Evidence for the formation of an unusual ternary complex of rabbit liver EF-1 α with GDP and deacylated tRNA // *FEBS Lett.*—1997.—407.—P. 13—17.
- Petrushenko Z. M., Budkevich T. V., Shalak V. F., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1A·GDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. Implications for tRNA channeling // *Eur. J. Biochem.*—2002.—269.—P. 4811—4818.
- Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1962.—8.—P. 1—3.
- Kazyro Y. The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation // *Biochim. et biophys. acta.*—1978.—505.—P. 95—127.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.
- Гудзера О. И., Сидорик Л. Л., Золотухина И. В., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Выделение серил-тРНК синтетазы из печени животных экспресс-методом // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 2.—С. 105—107.
- Kaminska M., Shalak V., Mirande M. The appended C-domain of human methionyl-tRNA synthetase has a tRNA-sequestering function // *Biochemistry*.—2001.—40, N 47.—P. 14309—14316.
- Dreher T. W., Uhlenbeck O. C., Browning K. S. Quantitative

- assessment of EF-1alpha. GTP binding to aminoacyl-tRNAs, aminoacyl-viral RNA, and tRNA shows close correspondence to the RNA binding properties of EF-Tu // *J. Biol. Chem.*—1999.—274, N 2.—P. 666—672.
14. *Lee J. S., Park S. G., Park H., Seol W., Lee S., Kim S.* Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2002.—291.—P. 158—164.
 15. *Reed V. S., Yang D. C. H.* Characterization of a novel N-terminal peptide in human aspartyl-tRNA synthetase. Roles in the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 32937—32941.
 16. *Reed V. S., Wasteny M. E., Yang D. C. H.* Mechanisms of the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 32932—32936.
 17. *Bec G., Kerjan P., Zha X. D., Waller J. P.* Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. I. Purification as a heterotypic complex in association with elongation factor 1 // *J. Biol. Chem.*—1989.—264.—P. 21131—21137.
 18. *Braandsma M., Kerjan P., Dijk J., Janssen G. M. C., Moller W.* Valyl-tRNA synthetase from *Artemia*. Purification and association with elongation factor 1 // *Eur. J. Biol. Chem.*—1995.—233.—P. 277—282.
 19. *Bec G., Waller J. P.* Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. II. The enzyme derived from the high-M_r complex displays hydrophobic as well as polyanion-binding properties // *J. Biol. Chem.*—1989.—264.—P. 21138—21143.
 20. *Bec G., Kerjan P., Waller J. P.* Reconstruction *in vitro* of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex. Essential roles of the NH₂-terminal extension of valyl-tRNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 2086—2092.
 21. *Negrutskii B. S., Shalakh V. F., Kerjan P., Etskaya A. V., Mirande M.* Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1alpha in the complex with EF-1H // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 4545—4550.
 22. *Kim J. E., Kim K. H., Lee S. W., Seol W., Shiba K., Kim S.* An elongation factor-associating domain is inserted into human cysteinyl-tRNA synthetase by alternative splicing // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28.—P. 2866—2872.

УДК 577.152.611:577.217.535
Надійшла до редакції 27.02.04