

Использование полиаминов для создания высокоэффективной реконструированной системы биосинтеза белка из печени кролика

С. С. Пальчевский

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Разработана реконструированная бесклеточная белоксинтезирующая система из печени кролика, содержащая высокоочищенные гомологичные компоненты аппарата трансляции. Использование спермина и спермидина позволило оптимизировать активность системы при физиологических концентрациях Mg^{2+} .

Введение. Из разнообразного набора методов, позволяющих изучать трансляцию *in vitro*, ключевое место занимает использование бесклеточных белоксинтезирующих систем. Применение подобных систем для исследования биосинтеза белка помогло установить как общие закономерности функционирования белоксинтезирующего аппарата, так и специфические особенности процесса трансляции у про- и эукариот [1].

Особое значение при изучении функционирования отдельных компонентов имеет создание реконструированных систем биосинтеза белка. При создании таких систем обычно используют компоненты белоксинтезирующего аппарата, выделенные из различных объектов, что существенно снижает их информативность. Так, к настоящему моменту в литературе не обнаружено описания высокоэффективной гомологичной системы животного происхождения. Кроме того, в разработанных системах трансляции синтетических полинуклеотидов, не имеющих иницирующих кодонов, оптимальная концентрация Mg^{2+} варьирует от 7 до 10 мМ, что является нефизиологичным для функционирования белоксинтезирующего аппарата. В то же время показано, что введение полиаминов в Mg^{2+}/NH_4^+ систему из *Escherichia coli* приводит как к уменьшению оптимальной концентрации Mg^{2+} , так и к увеличению уровня синтеза поли(Phe) [2, 3].

В настоящей работе впервые описана реконструированная белоксинтезирующая система, состоящая из очищенных гомологичных компонентов из печени кролика и характеризующаяся высокой скоростью полипептидного синтеза. Использование спермина и спермидина позволило оптимизировать активность системы при физиологических концентрациях Mg^{2+} .

Создание такой системы позволит в дальнейшем изучить ряд специфических особенностей аппарата трансляции высших эукариот.

Материалы и методы. В экспериментах использовали АТФ, ГТФ, эметин, креатинфосфокиназу («Sigma», США), креатинфосфат, НЕРЕС («Calbiochem», США); поли(U) («Boehringer Mannheim», Германия); β -меркаптоэтанол, NH_4Cl , $MgCl_2$, аммоний ванадат («Merck», Германия); [^{14}C]фенилаланин (13,32 ГБк/ммоль, UVVVR, Чехия); спермидин («Serva», Германия); спермин («Fluka», Швейцария).

Одним из необходимых условий создания данной реконструированной бесклеточной системы являлось использование в ней гомологичных компонентов белоксинтезирующего аппарата. Для этого из печени кролика были выделены 80S рибосомы и их субчастицы, суммарные АРСазы, факторы элонгации (*EF-1*, *EF-2*), препараты суммарной тРНК и индивидуальной тРНК^{Phe}.

Для получения 40S и 60S субчастиц рибосом использовали метод [4] с модификациями, описан-

ными в [5]. 80S рибосомы получали реассоциацией субчастиц при соотношении 40S/60S = 1/1,2.

Суммарный препарат аминоксил-тРНК синтез (АРСаз) выделяли по модифицированному методу, как в [6]. *EF-1* получали, используя комбинацию гель-фильтрации и ионообменной хроматографии, по [7]. *EF-2* выделяли, согласно [8]. Суммарную тРНК выделяли, согласно [9]. тРНК^{Phe}, Phe-тРНК^{Phe}, AcPhe-тРНК^{Phe} получали методом обращенной фазы в системе HPLC на колонке Nucleosil C4 в градиенте концентрации метанола [10]. Инкубационная смесь для синтеза полифенилаланина объемом 50 мкл содержала 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,5, переменные концентрации ионов магния, аммония, полиаминов спермина и спермидина, 2 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ АТР, 0,4 мМ ГТР, 10 мМ креатинфосфат, 2 мкг креатинфосфокиназы, 100 мкг поли(U), 194 пмоль [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}, 20 пмоль *EF-1*, 10 пмоль *EF-2*, 5 пмоль рибосом. В некоторых экспериментах использовали не Phe-тРНК^{Phe}, а суммарную тРНК, которую преинкубировали в течение 10 мин при 37 °С в указанной смеси, дополнительно содержащей 20 мкМ [¹⁴C]-фенилаланин, 70 мкг тРНК и 250 мкг суммарного препарата АРСаз. Последующую инкубацию осуществляли при той же температуре в течение 10 мин. Трансляцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,1 М КОН с последующим инкубированием смеси на протяжении 20 мин для разрушения аминоксил-тРНК. После окончания инкубации количество синтезированного полифенилаланина определяли по радиоактивности ТХУ-нерастворимого осадка на фильтрах GF/C («Whatman», Англия) в счетчике RackBeta 1219 фирмы «LKB» (Швеция).

Для связывания Ac[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} инкуба-

ционная смесь содержала в 30 мкл 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,6, 100 мМ NH₄Cl, 4 мМ MgCl₂, 0,6 мМ спермин, 0,8 мМ спермидин, 3,2 пмоль 80 S рибосом, 50 мкг поли(U) и переменные количества Ac[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}. Время инкубации 15 мин при 37 °С. Связывание Ac[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} с рибосомами определяли фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры.

Результаты и обсуждение. Для бесклеточных белоксинтезирующих систем, разработанных к настоящему времени, характерно варьирование в широких пределах концентраций и соотношений катионов, аминокислот, компонентов NTP-регенерирующей системы и т. д. В данной работе выбор концентраций АТР, ГТР, АТР-регенерирующей системы, β-меркаптоэтанол был произведен на основе ранее полученных результатов по разработке нефракционированных бесклеточных систем из животных тканей [11].

Наиболее важным моментом при создании бесклеточной системы, соответствующей работе аппарата трансляции *in vivo*, является использование физиологических концентраций Mg²⁺, оказывающего критическое влияние на конформацию и взаимодействие компонентов аппарата трансляции. На рис. 1, а, представлены результаты определения оптимальной концентрации ионов Mg²⁺ для синтеза полифенилаланина в бесклеточной системе из печени кролика. Наблюдается колоколообразная зависимость эффективности трансляции от концентрации ионов Mg²⁺, оптимум которой расположен в пределах 4—5 мМ. Полученные значения согласуются с результатами, описанными для других белоксинтезирующих систем, разработанных с использованием полиаминов. Так, добавление спермина, спермидина и путресцина существенно понижает

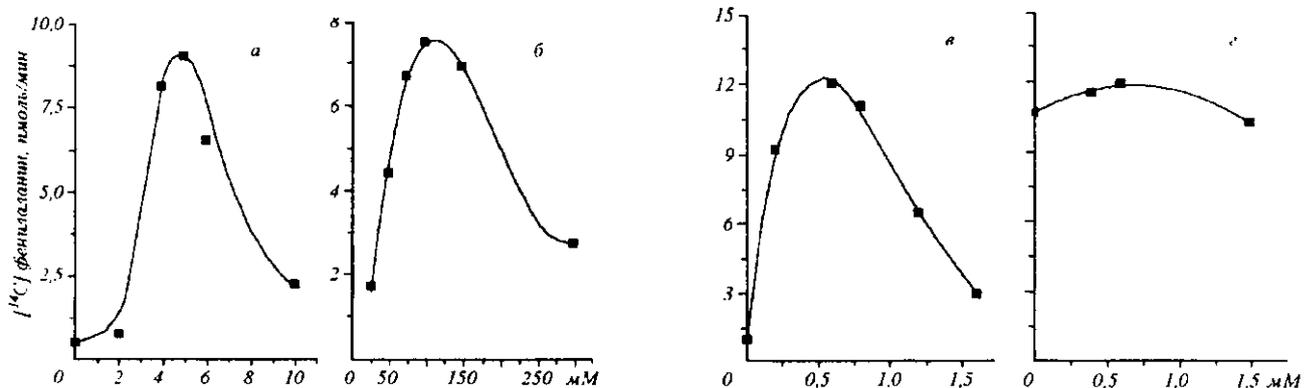


Рис. 1. Зависимость включения [¹⁴C]фенилаланина в продукт трансляции в бесклеточной системе из печени кролика от концентрации: а — ионов магния; б — ионов аммония; в — спермина; з — спермидина

оптимальную концентрацию Mg^{2+} в системах различного происхождения до 2—5 мМ [12—13].

Зависимость уровня включения фенилаланина в продукт трансляции от концентрации ионов аммония представлена на рис. 1, б. Эффективный синтез происходит в пределах концентраций NH_4Cl от 100 до 150 мМ.

Природные полиамины присутствуют во всех клетках и являются поливалентными катионами, играющими заметную роль в таких процессах, как репликация ДНК, транскрипция и трансляция. Эксперименты с различными бесклеточными системами показали, что действие полиаминов на трансляцию синтетических полинуклеотидов проявляется в стимуляции синтеза и частичном замещении действия ионов Mg^{2+} . Они влияют на такие этапы трансляции, как аминоацилирование [14], связывание аминоацил-тРНК с рибосомой [15], инициация белкового синтеза [16—17], элонгация пептидной цепи [18]. Полиамины обнаружены в изолированных рибосомах, но неизвестно, ассоциированы ли они с рибосомами *in vivo*. Их рассматривают как мощные синергисты Mg^{2+} , способствующие ассоциации субчастиц в рибосому. Влияние спермина и спермидина на уровень трансляции поли(U) в бесклеточной белоксинтезирующей системе показано на рис. 1 в, г. Диапазон концентраций спермина и спермидина для разработки данной системы был выбран в соответствии с [3]. Стимуляция синтеза полифенилаланина спермином наиболее выражена при концентрации 0,5—0,8 мМ, что соответствует их содержанию в тканях животных [19]. С возрастанием концентрации (1,5 мМ) эффективность включения быстро уменьшалась. Такая зависимость работы системы от спермина наблюдалась как в отсутствие, так и в присутствии спермидина. Эффект спермидина выражен существенно меньше.

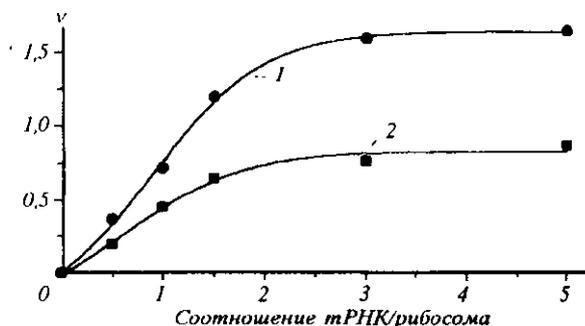


Рис. 2. Связывание $Ac[^{14}C]Phe$ -тРНК^{Phe} с 80S рибосомами из печени кролика: 1 — +поли(U); 2 — -поли(U)

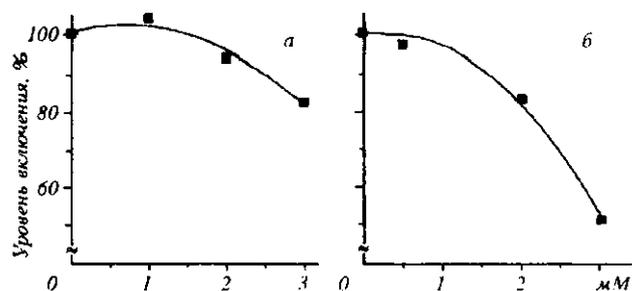


Рис. 3. Влияние различных концентраций ванадата аммония (а) и эметина (б) на эффективность трансляции поли(U) в бесклеточной белоксинтезирующей системе из печени кролика

Для характеристики качества системы белкового синтеза *in vitro* можно использовать два критерия: а) синтез белка должен происходить с близкими к *in vivo* скоростью и точностью; б) фракция рибосом, участвующих в белковом синтезе, должна быть максимально близкой к 100 %. Известно, что синтез бактериальных белков осуществляется со скоростью 10-20 пептидных связей за 1 с на рибосому, у позвоночных — приблизительно в три раза медленнее. В оптимизированной системе из *E. coli* была достигнута скорость полипептидного синтеза, близкая *in vivo* [20]. В лучших экспериментах полученной системы достигнута скорость 0,2—0,4 пептидной связи за 1 с на рибосому, что характеризует ее как достаточно эффективную из описанных реконструированных систем высших эукариот.

Второй критерий был частично проверен в экспериментах по связыванию тРНК с рибосомой, которое в определенной степени дает возможность установить фракцию активных рибосом. Связывание проводили в оптимизированных, как описано выше, условиях. Обнаружено, что в отсутствие поли(U) 0,9 молекулы $AcPhe$ -тРНК^{Phe} связывается с одной 80S рибосомой, в то время как в присутствии поли(U) связывание достигает 1,66 молекулы $AcPhe$ -тРНК^{Phe} на 80S рибосому (рис. 2). Поскольку максимум две молекулы $AcPhe$ -тРНК^{Phe} могут быть связаны с одной 80S рибосомой, то в данном случае 83 % рибосом активны в связывании тРНК. Указанная величина является довольно высокой при сравнении с величинами активных в связывании рибосом из других систем [2, 3, 20]. На основании вышеизложенного можно заключить, что полученная реконструированная бесклеточная система близка по условиям функционирования к физиологическим.

Чтобы проверить, насколько адекватна разработанная система к действию ингибиторов белкового синтеза, были использованы ингибитор эукарио-

тической трансляции на неустановленном этапе алкалоид эметин [21] и ванадат аммония — ингибитор трансляции различных эукариотических систем [21, 22]. Действие этих ингибиторов на трансляцию рибосомами поли(U) представлено на рис. 3. Наблюдается 50 %-е ингибирование включения фенилаланина при добавлении относительно высокой концентрации эметина (3 мМ), в то время как в системе трансляции из дрожжей такой уровень ингибирования был достигнут уже при 0,5 мМ концентрации эметина [23]. Ванадат аммония снижает уровень синтеза полифенилаланина на 20 % при концентрации 3 мМ. Эти данные свидетельствуют о том, что разработанная система довольно устойчива к действию ингибиторов трансляции.

С. С. Пальчевский

Використання поліамінів для розробки високоефективної реконструйованої системи біосинтезу білка з печінки кроля

Резюме

Розроблено реконструйовану безклітинну білоксинтезуючу систему з печінки кроля, що містить в собі високоочищені гомологічні компоненти апарату трансляції. Використання сперміну та спермідину дало змогу оптимізувати активність системи при фізіологічній концентрації Mg^{2+} .

S. S. Palchevskii

The use of polyamines for creation of effective reconstructed protein synthesizing system from rabbit liver

Summary

A cell-free reconstructed protein-synthesizing system from rabbit liver has been developed. The system contains highly purified homologous components of translation apparatus and is characterized by a sufficient rate of polypeptide synthesis. The use of spermine and spermidine has allowed to optimize the activity of the system at physiological concentration of Mg^{2+} .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Угарова Т. Ю. Эукариотические бесклеточные белоксинтезирующие системы // Итоги науки и техники.—М.: ВИНТИ, 1976.—Т. 7.—С. 58—141.
2. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. The ribosomal E site at low Mg^{2+} : Coordinate inactivation of ribosomal functions at Mg^{2+} concentrations below 10 mM and its prevention by polyamines // J. Biomol. Struct. Dyn.—1987.—5, N 2.—P. 435—446.
3. Bartetzko A., Nierhaus K. H. Mg^{2+}/NH_4^+ /polyamine system for polyuridine-dependent polyphenylalanine synthesis with near *in vivo* characteristics // Meth. Enzymol.—1988.—164.—P. 650—658.
4. Falvey A. K., Staehelin T. Structure and function of mammalian ribosomes. I. Isolation and characterization of active liver ribosomal subunits // J. Mol. Biol.—1970.—53, N 1.—P. 1—19.
5. Потапов 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.
6. Keller E., Zamecnik P. The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labelled amino acids into proteins // J. Biol. Chem.—1956.—221, N 1.—P. 45—49.
7. Negrutskii B. S., Budkevich T. V., Shalak V. F. et al. Rabbit translation elongation factor 1a stimulates the activity of homologous aminoacyl-tRNA synthetase // FEBS Lett.—1996.—382.—P. 18—20.
8. Iwasaki K., Kaziro Y. Polypeptide chain elongation factors from pig liver // Meth. Enzymol.—1979.—60.—P. 657—676.
9. Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1962.—8, N 1.—P. 1—3.
10. Triana-Alonso F. J., Chakrabarty K., Nierhaus K. H. The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor // J. Biol. Chem.—1995.—270, N 35.—P. 20473—20478.
11. Желтовская Н. И., Турковская Г. В., Яремчук А. Д., Ельская А. В. Эукариотические тРНК-зависимые бесклеточные системы биосинтеза белка // Методы молекуляр. биологии: Сб. науч. тр.—Киев: Наук. думка, 1979.—С. 90—98.
12. Takeda Y. Polyamines and protein synthesis. I. The effect of polyamines on cell free polyphenylalanine synthesis in *Escherichia coli* // J. Biochem.—1969.—66, N 3.—P. 345—349.
13. Atkins J. F., Lewis J. B., Anderson C. W., Gesteland R. F. Enhanced differential synthesis of proteins in a mammalian cell-free system by addition of polyamines // J. Biol. Chem.—1975.—250, N 14.—P. 5688—5695.
14. Igarashi K., Eguchi K., Tanaka M., Hirose S. Effect of polyamines on isoleucyl-tRNA formation by rat-liver isoleucyl-tRNA synthetase // Eur. J. Biochem.—1978.—82.—P. 301—307.
15. Igarashi K., Sugawara K., Izumi I. et al. Effect of polyamines on polyphenylalanine synthesis by *Escherichia coli* and rat-liver ribosomes // Ibid.—1974.—48.—P. 425—502.
16. Konicki K., Kramer G., Pinphanickakary P., Hardesty B. Polyamines are necessary for maximum *in vitro* synthesis of globin peptides and play a role in chain initiation // Arch. Biochem. and Biophys.—1975.—169.—P. 192—198.
17. Igarashi K., Kojima M., Watanabe Y. et al. Stimulation of polypeptide synthesis by spermidine at the level of initiation in rabbit reticulocyte and wheat germ cell-free systems // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1980.—97.—P. 480—486.
18. Hunter A. R., Farrel P., Jackson R. J., Hunt T. The role of polyamines in cell-free protein synthesis in the wheat-germ system // Eur. J. Biochem.—1977.—75.—P. 149—157.
19. Tabor C. W., Tabor H. 1,4 diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine // Annu. Rev. Biochem.—1976.—45.—P. 285—306.
20. Wagner E. G. H., Jelenc P. C., Ehrenberg M., Kurland C. G. Rate of elongation of polyphenylalanine *in vitro* // Eur. J. Biochem.—1982.—122.—P. 193—197.
21. Vazquez D. Inhibitors of protein biosynthesis.—Berlin: Springer, 1979.—P. 161—168.
22. Uritani M., Miyazaki M. Characterization of the ATPase and GTPase activities of elongation factor 3 (EF-3) purified from yeast // J. Biochem.—1988.—103, N 3.—P. 522—530.
23. Jimenez A., Carrasco L., Vazquez D. Enzymic and nonenzymic translocation by yeast polysomes. Site of action of a number of inhibitors // Biochemistry.—1977.—16, N 21.—P. 4727—4730.

УДК 577.217.39

Поступила в редакцию 31.07.96