

Изучение различных физико-химических характеристик неканонического комплекса эукариотического фактора элонгации eEF-1A с деацилированной тРНК

Т. В. Будкевич, Б. С. Негруцкий, И. Н. Сердюк¹, А. В. Ельская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹Институт белка РАН
Пушино, Московская обл., Россия

Эукариотический фактор элонгации 1A (eEF-1A) играет важную роль в трансляции, катализируя GTP-зависимое связывание аминоксил-тРНК (aa-тРНК) с акцепторным (A) сайтом рибосомы. Классическая схема биосинтеза белка предусматривает существование комплекса eEF-1A в GTP-связанной форме с aa-тРНК. Однако несколькими независимыми методами было показано формирование в условиях in vitro необычного тройного комплекса [eEF-1A·GDP·тРНК]. Выдвинуто предположение о роли неканонического комплекса в цикле каналирования (channeling) тРНК в ходе элонгации трансляции у высших эукариот. Задачей представленного исследования было определение константы диссоциации [eEF-1A·GDP·тРНК] комплекса методом стационарной флуоресцентной поляризации, а также радиуса инерции комплекса [eEF-1A·GDP·тРНК] методом малоуглового нейтронного рассеяния (small angle neutron scattering — SANS).

Введение. Характерной особенностью аппарата белкового синтеза высших эукариот является высокий уровень структурной организации, обеспечивающий его эффективное функционирование. Именно пространственная и функциональная компартментализация всех компонентов, участвующих в осуществлении последовательных биохимических реакций на данном метаболическом пути, позволяет избежать неспецифических влияний других метаболических процессов, происходящих в эукариотической клетке. Одним из механизмов, который способен реализовать потенциальные преимущества компартментализации компонентов аппарата трансляции высших эукариот, является каналирование (channeling) аминоксил-тРНК (aa-тРНК). Каналирование в ходе белкового синтеза было подтверждено экспериментально в условиях *in vivo* [2], и предполагает прямой перенос «из рук в

руки» aa-тРНК от места синтеза (аминоксил-тРНК синтетаза) к месту использования (рибосома) и обратно. Основным претендентом на роль посредника в этом процессе является фактор элонгации 1A. Идея об участии фактора элонгации 1A в каналировании тРНК в ходе белкового синтеза подразумевает формирование ряда необычных, неканонических комплексов данного белка с другими компонентами аппарата трансляции, в частности, с деацилированной тРНК.

Материалы и методы. GDP-связанную форму eEF-1A получали, как описано в [3]. Препараты суммарной тРНК получали согласно [4]. Процедуру модификации eEF-1A флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC, изомер I) проводили по стандартной методике [5] с небольшими изменениями, позволяющими сохранить максимум активности белка в функциональных тестах и добиться степени модификации 1 молекула красителя/1 молекула белка. Стационарную поляризацию измеряли в «L»-формате на спектрофлуориметре «Hitachi Sci. Instrs.»

(Япония), оснащенном поляризаторами, в режиме «Time scan». Длина волны возбуждения равна 495 нм, длина волны испускания — 525 нм. Изменение состояния поляризации определяли по формуле

$$P = (I_{\text{пар}} - G \cdot I_{\text{пер}}) / (I_{\text{пар}} + G \cdot I_{\text{пер}}),$$

где $I_{\text{пар}}$ — интенсивность параллельной компоненты, $I_{\text{пер}}$ — интенсивность перпендикулярной компоненты, G — фактор, представляющий собой соотношение чувствительностей детектирующей системы для вертикально и горизонтально поляризованного света. В нашем случае $G = 1,22$. Для оценки K_d была выбрана $I_{\text{пер}}$, изменения которой подчиняются линейному закону [6]. Значения интенсивностей скорректированы с учетом разведения и нормированы по формуле

$$I_{\text{норм}} = (I_0 - I_{\text{тРНК}}) / (I_0 - 1),$$

где $I_{\text{норм}}$ — нормированная интенсивность испускания, I_0 — интенсивность флюоресценции в начале эксперимента (без добавления тРНК), $I_{\text{тРНК}}$ — интенсивность при определенной концентрации тРНК. Полученные значения трех независимых экспериментов были аппроксимированы гиперболой с помощью метода наименьших квадратов:

$$I_{\text{норм}} = I_{\text{кон}} \cdot C / K_d + C,$$

где $I_{\text{кон}}$ — нормированная интенсивность в конечной точке титрования, C — концентрация тРНК, K_d — константа диссоциации. Эксперименты по малугловому нейтронному рассеянию проводили в тесном сотрудничестве с проф. И. Н. Сердюком в SANS камере Института Поля Шреррера (Швейцария). Разрешение 6—10 %, диапазон векторов рассеяния $s = 0,1—2,5 \text{ нм}^{-1}$. Длина волны нейтронов 0,6 нм. Образцы помещали в термостатированную кварцевую кювету толщиной 0,1 см и объемом 150 мкл, где поддерживали температуру 4 °С. Время измерения в расчете на один образец составляло 1—2 ч. Исходные данные корректировали на абсолютную шкалу путем калибровки на рассеяние легкой воды, измеренное в тех же условиях.

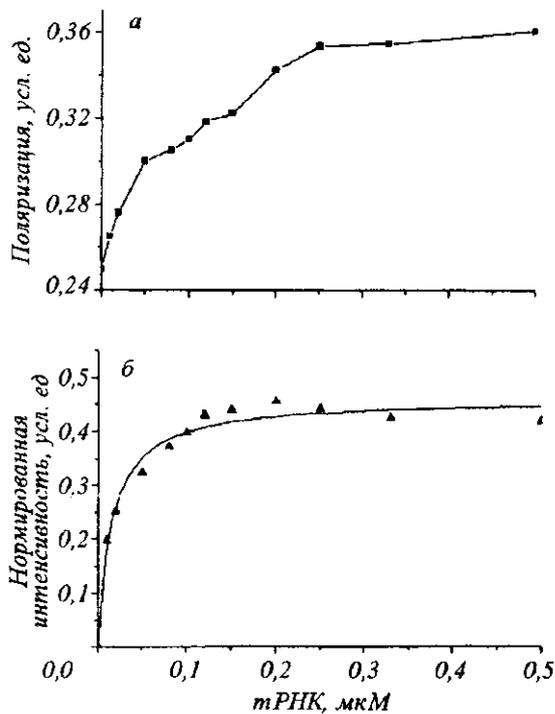
Результаты и обсуждение. Связывание FITC-eEF-1A·GDP с тРНК изучали, измеряя стационарную флюоресцентную поляризацию FITC-производных белка в присутствии деацилированной тРНК. Фиксированную концентрацию FITC-eEF-1A·GDP (0,2 мкМ) титровали, добавляя аликвоты тРНК в диапазоне $1 \cdot 10^{-8}—1 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ (конечная концентрация 0,5 мкМ), определяя состояние поляризации после каждого добавления. Зависимость изменения состояния поляризации при возрастании концентрации тРНК представлена на рисунке (а).

Наблюдаемое возрастание P от 0,25 для свободного FITC-eEF-1A·GDP до 0,352 в присутствии максимальной концентрации тРНК является следствием различий во вращательной диффузии свободного белка по сравнению с тРНК-белковым комплексом. Полученные экспериментальные данные были проанализированы, как описано в «Материалах и методах», и аппроксимированы гиперболой (рисунок, б). K_d для комплекса [FITC-eEF-1A·GDP·тРНК] составила 20 нМ.

Ранее нами было высказано предположение [1] о том, что eEF-1A, находясь в GDP-связанной форме после гидролиза GTP при взаимодействии aa-тРНК с А-сайтом рибосомы, способен связывать деацилированную тРНК, диссоциировать из Е-сайта в виде неканонического тройного комплекса [eEF-1A·GDP·тРНК] и переносить тРНК на аминоацил-тРНК синтетазу, замыкая, таким образом, цикл каналирования тРНК. Высокая стабильность неканонического комплекса [eEF-1A·GDP·тРНК], оцененная в равновесных условиях флюоресцентных экспериментов, свидетельствует в пользу функциональной значимости подобного комплекса. Такая стабильность хорошо согласуется с нашим предположением о возможной роли этого комплекса в процессе передачи деацилированной тРНК от Е-сайта рибосом к аминоацил-тРНК синтетазе. Поскольку K_d между деацилированной тРНК и Е-сайтом рибосом в 30 раз выше (590 нМ) [7], чем для комплекса [eEF-1A·GDP·тРНК], можно предположить, что перенос тРНК от Е-сайта к eEF-1A происходит благодаря градиенту сродства тРНК к различным последовательным участникам процесса биосинтеза белка.

Для глобулярных белков существует прямая зависимость между логарифмом их молекулярной массы (M) и $\lg R_g$, где R_g — радиус инерции. При изучении структурных параметров eEF-1A·GDP методом SANS был определен R_g двойного комплекса — 5,16 нм. R_g для eEF-1A (M , 45 кДа) составляет 2,25 нм [8]. Следовательно, определенный нами R_g для свободного белка значительно превышает цифру, ожидаемую для глобулярного белка с M , 50 кДа. Данный факт свидетельствует о развернутости пространственной структуры eEF-1A·GDP. Согласно полученным результатам, при взаимодействии с деацилированной тРНК белок структурируется, приобретая глобулярность.

Таким образом, при формировании комплекса в молекуле белка наблюдаются значительные конформационные изменения, в результате которых необычный тройной комплекс имеет более компактную структуру, чем свободный белок. Одним из возможных объяснений наблюдаемого эффекта



Изучение связывания tPHK с FITC-eEF-1A·GDP методом стационарной флуоресцентной поляризации: а — типичная кривая изменения состояния поляризации FITC-eEF-1A·GDP при добавлении возрастающих концентраций tPHK; б — гиперболическая зависимость нормированных значений интенсивностей перпендикулярной компоненты ($I_{\text{пер}}$)

tPHK на форму двойного комплекса eEF-1A·GDP может быть предположение о том, что в результате связывания с отрицательно заряженной молекулой нуклеиновой кислоты нейтрализуется положительный заряд поверхности белковой молекулы (pI 9,1), что приводит к точной укладке последней.

Т. В. Будкевич, Б. С. Негруцкий, І. Н. Сердюк, Г. В. Ельська

Вивчення різних фізико-хімічних характеристик неканонічного комплексу еукаріотичного фактора елонгації eEF-1A з деацильованою tPHK

Резюме

Вперше за допомогою методу стаціонарної флуоресцентної поляризації визначено константу дисоціації [eEF-1A·GDP] з вільною tPHK. Отримане значення — 20 нМ, дозволяє припустити фізіологічну важливість досліджуваного неканонічного комплексу. При використанні методу малокутового нейтрон-

ного розсіювання вивчали форму [eEF-1A·GDP] комплексу. При порівнянні отриманого радіуса інерції для еукаріотичного фактора елонгації з аналогічним параметром для EF-1A було зроблено висновок щодо існування розгорнутої просторової структури eEF-1A, яка набуває глобулярності при взаємодії з деацильованою tPHK.

T. V. Budkevich, B. S. Negrutskii, I. N. Serdyuk, A. V. El'skaya

Study of different physical and chemical parameters of non-canonical complex of eukaryotic translation elongation factor 1A with deacylated tRNA

Summary

For the first time the K_d of [eEF-1A·GDP] with free tRNA was determined by steady state fluorescence polarization. The obtained value — 20 nM is allowed to suppose a physiological significance of the complex investigated. For the first time the solution conformation of rabbit liver [eEF-1A·GDP] and its complex with tRNA has been studied by small-angle neutron scattering (SANS). The shape of the [eEF-1A·GDP] molecule in solution is demonstrated to be rather relaxed and to undergo rather substantial changes upon formation of the complex with tRNA. The complex has a more compact structure than free [eEF-1A·GDP].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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 complex of rabbit liver EF-1 α with GDP and deacylated tRNA // FEBS Lett.—1997.—407.—P. 13—17.
2. 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.
3. Shalak V. F., Budkevich T. V., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Fast and effective method for purification of EF-1 α from rabbit liver // Укр. біохім. журн.—1997.—69.—С. 104—109. (In English.)
4. 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.
5. Weiel J., Hershey J. W. B. Fluorescence polarization studies of the interaction of *Escherichia coli* protein synthesis initiation factor 3 with 30S ribosomal subunits // Biochemistry.—1981.—4, N 20.—P. 5859—5865.
6. Jameson D. M., Seifried S. E. Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization // Methods.—1999.—19.—P. 222—233.
7. Graifer D. M., Nekhai S. Y., Mundus D. M., Fedorova O. F., Karpova G. G. Interaction of human and *Escherichia coli* tRNA^{Phe} with human 80S ribosomes in the presence of oligo- and polyuridylylate templates // Biochim. et biophys. acta.—1992.—1171.—P. 56—67.
8. Bilgin N., Ehrenberg M., Ebel C., Zaccai G., Sayers Z., Koch M. H. J., Svergun D., Barberato C., Volkov V., Nissen P., Nyborg J. Solution structure of the ternary complex between aminoacyl-tRNA, elongation factor Tu, and guanosine triphosphate // Biochemistry.—1998.—37.—P. 8163—8172.

УДК 577.152.611

Поступила в редакцию 07.08.2000