

К. А. Солдаткин, А. П. Потапов

## КАК ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ EF-Tu, ТАК И ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ EF-G МОГУТ ОГРАНИЧИВАТЬ СПОСОБНОСТЬ 70S РИБОСОМ ESCHERICHIA COLI ТРАНСЛИРОВАТЬ ПОЛИ (dT)

Для выяснения возможных механизмов влияния белковых факторов элонгации на специфичность рибосом к структуре сахаров матрицы было изучено действие EF-Tu и/или EF-G на способность 70S рибосом *E. coli* транслировать поли(dT) и поли(U). Показано, что оба фактора элонгации способны подавлять трансляцию поли(dT), наблюдаемую в их отсутствие, при определенных концентрациях ионов магния. Антибиотик неомицин может промотировать эффективнее считывание поли(dT) не только в присутствии обоих факторов, но и одного EF-Tu (в отличие от EF-G). Приведенные данные свидетельствуют о том, что специфичность 70S рибосом к структуре сахаров матрицы, равно как и их чувствительность к действию неомицина, по-видимому, определяется на уровне взаимодействия тРНК с А-сайтом рибосомы.

**Введение.** В рамках проверки гипотезы о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов, предполагающей прямое взаимодействие декодирующего центра рибосомы с сахарофосфатным остовом кодон-антикодонового дуплекса [1—4], были получены данные, свидетельствующие о наличии определенной специфичности рибосом к структуре сахаров матричного полинуклеотида как в отсутствие, так и в присутствии белковых факторов элонгации [5—7]. В частности, была обнаружена способность 70S рибосом *E. coli* к достаточно эффективной бесфакторной трансляции поли(dT) (но не поли(U)). Было также показано, что в полной факторной системе определяющим для возможности трансляции поли(dT) является этап связывания аминоксил-тРНК и/или транслокация. Антибиотик неомицин, стимулирующий трансляцию поли(dT) в присутствии факторов элонгации, ингибировал эту трансляцию в бесфакторной системе [6, 7]. Однако осталось неясным, действие какого из факторов элонгации определяет разницу матричных свойств поли(dT) в бесфакторной и факторзависимой системах, а также различия в эффекте неомицина в этих системах.

Целью данной работы было изучение влияния белковых факторов элонгации, EF-Tu и EF-G, вместе и по отдельности на поли(dT)-зависимое взаимодействие фенилаланил-тРНК с 70S рибосомами *E. coli* в присутствии и отсутствие неомицина.

**Материалы и методы.** 30S и 50S субчастицы рибосом, а также [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (1460 пмоль/1 ед. A<sub>260</sub>) *E. coli* MRE600 были любезно предоставлены В. И. Махно (ЛИЯФ им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина). Белковые факторы элонгации EF-Tu и EF-G из *E. coli* были любезно предоставлены Н. В. Беличиной (Ин-т биохимии им. Баха АН СССР, Москва). Поли(U) производства фирмы «Reanal» (Венгрия); поли(dT) — НИКТИ БАН (Бердск); [<sup>14</sup>C]фенилаланин (13,3 ГБк/ммоль) — ЧСФР; неомицин — фирмы «Boehringer» (ФРГ); АТР, ГТР, креатинфосфат, креатинфосфокиназа — фирмы «Calbiochem» (США).

Получение [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из дрожжей. Суммарный препарат тРНК получали по [8]; [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> — по [9] с помощью двух хроматографий на БД-целлюлозе.

Трансляция синтетических полинуклеотидов. Пробы (50 мкл) содержали: 20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl 12 или 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5—8 пмоль 30S субчастиц, 8—12 пмоль 50S субчастиц, 40—45 пмоль [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из *E. coli* или дрожжей, 2 мкг поли(dT) или 5 мкм поли(U). Количество образующихся олигофенилаланинов определяли с помощью хроматографии на бумаге FN-15 в растворителе *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (78 : 5 : 17) [7, 10].

Уровень связывания тРНК с рибосомами  $\bar{v}$ , т. е. количество связанных с одной рибосомой остатков фенилаланина, определяли с помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах HW-45 («Millipore») по [11]. При изучении влияния фактора элонгации *EF-Tu* его добавляли сначала к препарату аминоксил-тРНК, преинкубировали 10—15 мин на ледяной бане (в ионных условиях, используемых в данном опыте) и лишь затем вносили рибосомы и матрицу. Рибосомы для предварительного заполнения Р-сайта также преинкубировали с эквимольным или немного большим количеством Phe-тРНК<sup>Phe</sup> в тех же

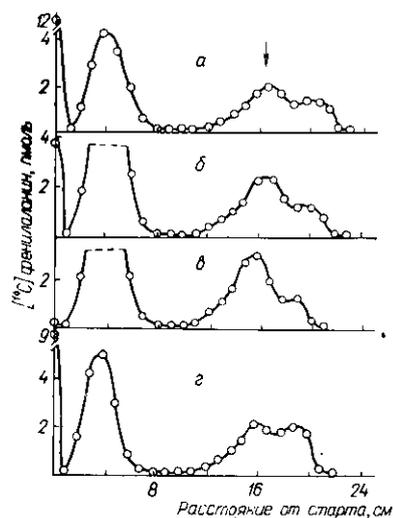


Рис. 1

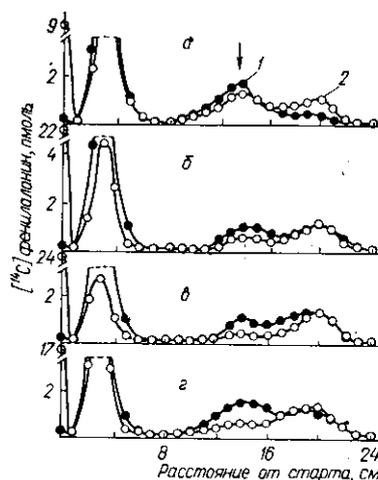


Рис. 2

условиях. Пробы дополнительно содержали 0,2 мМ GTP, 6 мМ креатинфосфат и 1 мкг креатинфосфокиназы. Аналогичную процедуру осуществляли и при изучении влияния *EF-G* и обоих факторов.

**Результаты и обсуждение.** Поскольку приведенные в [6, 7] данные о бесфакторной трансляции поли(dT) были получены с использованием дрожжевой Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, необходимо было сначала проверить способность тРНК из *E. coli* обеспечивать эту бесфакторную трансляцию. Из рис. 1 (где приведены результаты хроматографии олигофенилаланинов, образующихся на поли(dT)-программированных рибосомах в присутствии Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из дрожжей (а) и *E. coli* (б—г) в отсутствие факторов элонгации (пробы содержали 7 пмоль 30S субчастиц, 12 пмоль 50S субчастиц, 40 пмоль дрожжевой или 44 пмоль [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из *E. coli*, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>; инкубация 1,5 ч при 5 °С (а, б) или 15 мин при 37 °С (в, г); в — в присутствии 100 мкМ неомицина; стрелкой показано положение дифенилаланина)) видно, что 70S рибосомы способны с помощью Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из *E. coli* транслировать поли(dT) в отсутствие факторов элонгации как при низкой, так и при высокой температуре, хотя и с несколько меньшей, чем при использовании дрожжевой тРНК, эффективностью.

Внесение белковых факторов элонгации при этих же условиях (20 мМ Mg<sup>2+</sup>) не приводит к качественному изменению ситуации по сравнению с бесфакторной системой (рис. 2: хроматография олигофенилаланинов, образующихся на поли(dT)-программированных рибосомах в отсутствие факторов элонгации (а) и в присутствии *EF-Tu* (б), *EF-Tu*+*EF-G* (в) и *EF-G* (г) при 20 мМ Mg<sup>2+</sup> (пробы содержали 6 пмоль 30S субчастиц, 10 пмоль 50S субчастиц, 120 пмоль *EF-Tu* (б, в), 35 пмоль *EF-G* (в, г), 40 пмоль [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из *E. coli* (в том числе 8 пмоль — преинкубация 90 мин при 40 °С); инкубация 15 мин при 37 °С; 1 — без неомицина, 2 — 100 мкМ неомицин; стрелкой показано положение дифенилаланина; величина  $\bar{v}$  после преинкубации составляла 0,09)). Оба фактора как вместе, так и по отдельности не-

сколько стимулируют трансляцию поли(dT), а добавление 100 мкМ неомицина приводит к ингибированию синтеза длинных (остаются на старте хроматограмм и могут быть осаждены ТХУ [7]) и накоплению коротких олигопептидов во всех случаях.

При понижении концентрации  $Mg^{2+}$  до 12 мМ ситуация резко меняется. Присутствие *EF-Tu* и/или *EF-G* вызывает ингибирование не только довольно слабой в этих условиях бесфакторной трансляции поли(dT), но и, по всей видимости, поли(dT)-зависимого связывания Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (рис. 3: хроматография олигофенилаланинов, образующихся на поли(dT)-программированных рибосомах в отсутствие факторов элонгации (а) и в присутствии *EF-Tu* (б), *EF-Tu*+*EF-G* (в) и *EF-G* (з) при 12 мМ  $Mg^{2+}$  (пробы содержали 5,6 пмоль 30S субчастиц, 9 пмоль 50S субчастиц, 120 пмоль *EF-Tu* (б, в), 27 пмоль

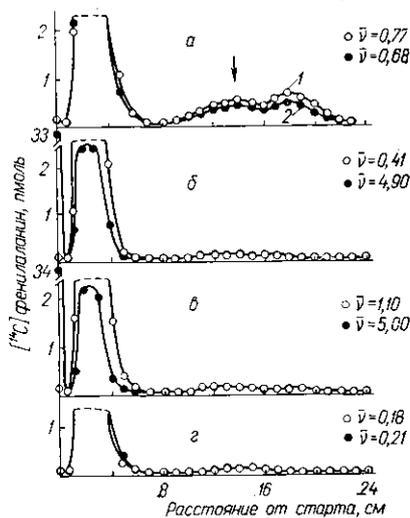


Рис. 3

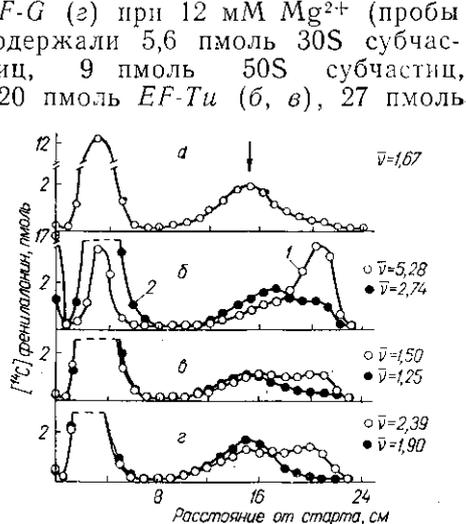


Рис. 4

*EF-G* (в, з), 40 пмоль [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> из *E. coli* (в том числе 8 пмоль — преинкубация 90 мин при 4 °С); инкубация 20 мин при 37 °С; 1 — без неомицина; 2 — 10 мкМ неомицин; стрелкой показано положение дифенилаланина;  $\bar{v}$  после преинкубации — 0,85), поскольку в присутствии белковых факторов снижается не только количество синтезируемых олигофенилаланинов, но и уровень связывания тРНК. Последний уменьшается даже по сравнению с исходным уровнем заполнения рибосом, наблюдаемым после преинкубации, что, очевидно, связано с диссоциацией тРНК при повышении температуры до 37 °С.

Внесение неомицина в присутствии обоих факторов элонгации приводит к сильнейшей стимуляции трансляции поли(dT) с образованием достаточно длинных пептидов, о чем свидетельствует увеличение радиоактивности на старте хроматограмм (см. рис. 3). Следует особо подчеркнуть, что количественно равный эффект наблюдается и при наличии одного *EF-Tu*, но не *EF-G*. Это свидетельствует об определяющей роли *EF-Tu*-зависимого связывания Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с рибосомой в разблокировании неомицином считывания поли(dT) в полной факторной системе.

В системе с поли(U)-программированными рибосомами, как и следовало ожидать, оба фактора вместе стимулируют трансляцию (рис. 4: хроматография олигофенилаланинов, образующихся на поли(U)-программированных рибосомах в отсутствие факторов элонгации (а) и в присутствии *EF-Tu*+*EF-G* (б), *EF-G* (в) и *EF-Tu* (з) при 12 мМ  $Mg^{2+}$  (экспериментальные условия такие же, как указаны в рис. 3;  $\bar{v}$  после преинкубации — 0,87)). По отдельности они также способствуют образованию некоторого количества три- и тетрафенилаланина, но не более длинных пептидов. Неомицин во всех случаях подавляет трансляцию поли(U).

Таким образом, белковые факторы элонгации, *EF-Tu* и *EF-G*, в условиях, оптимальных для считывания поли(U), способны подавлять бесфакторную трансляцию поли(dT) уже, по всей видимости, на уровне связывания аминоксил-тРНК. Особенно интересен эффект ингибирования трансляции поли(dT) фактором *EF-Tu*. С одной стороны, именно *EF-Tu*-зависимая однофакторная система оказалась чувствительной к стимулирующему трансляцию поли(dT) действию неомицина и, с другой стороны, снижение эффективности трансляции в однофакторной системе с *EF-G* наблюдалось и для поли(U)-зависимого процесса [12], что, очевидно, является следствием его (*EF-G*) действия в условиях пониженного сродства аминоксил-тРНК к рибосоме. Ингибирующее же влияние *EF-Tu* свидетельствует, вероятно, о повышении в его присутствии специфичности рибосомы к сахарофосфатному остову декодируемого в А-сайте кодона. Известно, что *EF-Tu* играет, по-видимому, существенную роль в обеспечении высокой точности отбора аминоксил-тРНК на рибосоме, о чем свидетельствуют результаты работ с мутантными формами этого фактора [13, 14], а также данные о большей точности декодирования в *EF-Tu*-зависимой системе трансляции по сравнению с бесфакторной [15]. Сходная корреляция между неоднозначностью считывания поли(U) и эффективностью трансляции поли(dT) для рибосом с различными мутациями в белке *S12* была показана в [16]. Это наводит на мысль об определенной общности механизмов, обеспечивающих специфичность рибосомы и к нуклеотидной последовательности, и к структуре сахаров декодируемого кодона. Факторы элонгации же (в первую очередь *EF-Tu*), по-видимому, могут увеличивать эту специфичность в обоих случаях и, возможно, также по сходному механизму. Примером такого механизма может быть постулированное гипотезой [1—4] прямое взаимодействие декодирующего центра рибосомы с сахарофосфатным остовом кодон-антикодонного дуплекса, происходящее при отборе аминоксил-тРНК в А-сайте и ее последующей транслокации в Р-сайт. Конформационный переход этого рибосомного участка, необходимый для циклического осуществления такого взаимодействия, предположительно стимулируется белковыми факторами элонгации [4].

Что касается стимуляции неомицином *EF-Tu*-зависимой трансляции поли(dT), то ее, вероятно, можно было бы объяснить стабилизирующим ослабленным в присутствии фактора связывание Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с поли(dT)-программированной рибосомой действием антибиотика. Такое объяснение хорошо согласуется с данными [17] о способности неомицина стабилизировать *EF-Tu*-зависимое образование комплекса аминоксил-тРНК с А-сайтом рибосомы, программированным «чужим» или укороченным до динуклеотида кодоном. Кроме того, подобной стабилизацией могло бы объясняться и наблюдаемое ингибирование неомицином транслокации.

Таким образом, в соответствии с рассматриваемой гипотезой [1—4] специфичность 70S рибосом *E. coli* по отношению к структуре сахаров матрицы, равно как и их чувствительность к действию неомицина, определяется прежде всего на уровне взаимодействия Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с А-сайтом, проявляясь либо на этапе *EF-Tu*-зависимого связывания аминоксил-тРНК, либо на этапе транслокации. Белковые факторы элонгации (в первую очередь *EF-Tu*) способны повышать эту специфичность в пользу рибонуклеотидной матрицы.

Авторы благодарят С. В. Кириллова, В. И. Махно, Н. В. Бслищну за содействие в выполнении данной работы.

#### Резюме

Для з'ясування можливих механізмів впливу білкових факторів елонгації на специфічність рибосом до структури цукрів матриці була вивчена дія *EF-Tu* та/або *EF-G* на здатність 70S рибосом *E. coli* транслювати полі(dT) і полі(U). Показано, що обид-

ва фактори елонгації здатні пригнічувати трансляцію полі(dT), що спостерігається за їх відсутністю, при певних концентраціях іонів магнію. Антибіотик неоміцин може промотувати ефективне зчитування полі(dT) не тільки в присутності обох факторів, але і одного *EF-Tu* (на відміну від *EF-G*). Приведені дані свідчать про те, що специфічність 70S рибосом до структури цукрів матриці, як і їх чутливість до дії неоміцину, очевидно, визначається на рівні взаємодії тРНК з А-сайтом рибосоми.

#### Summary

To elucidate the question whether the elongation factors influence the specificity of the ribosome to a template sugar structure, the effect of EF-Tu and/or EF-G on the ability of *Escherichia coli* 70S ribosomes to translate poly(U) or poly(dT) was investigated. Both elongation factors appeared to suppress poly(dT) translation observed in their absence under certain magnesium ion concentrations. Antibiotic neomycin promoted effectively poly(dT) translation in the presence not only of both factors but of EF-Tu alone (in contrast to EF-G) as well. The results presented suggest that tRNA interaction with the ribosomal A site is mainly responsible for the specificity of the 70S ribosomes to a template sugar structure as well as ribosomal specificity to neomycin action.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // FEBS Lett.—1982.—146, N 1.—P. 5—8.
2. Потопов А. П. Стереоспецифический механизм отбора аминоксил-тРНК рибосомой // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1982.—№ 5.—С. 100—102.
3. Потопов А. П. Механизм трансляции пептидил-тРНК и мРНК в рибосоме // Там же.—№ 6.—С. 73—75.
4. Потопов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.—1985.—46, № 1.—С. 63—77.
5. Сравнительное изучение матричной активности поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *Escherichia coli* и зародышей пшеницы / А. П. Потопов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 3.—С. 133—138.
6. Солдаткин К. А., Потопов А. П., Ельская А. В. Бесфакторный поли(dT)-зависимый синтез олигофенилаланина на 70S рибосомах *Escherichia coli* // Там же.—1987.—3, № 3.—С. 160—163.
7. Role of a template sugar-phosphate backbone in the ribosomal decoding mechanism. Comparative study of poly(U) and poly(dT) template activity / A. P. Potapov, K. A. Soldatkin, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya // J. Mol. Biol.—1988.—203, N 4.—P. 885—893.
8. Zubay C. The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid // Ibid.—1962.—4, N 3.—P. 347—356.
9. Gillam I. C., Tener C. M. The use of BD-cellulose in separation of transfer RNA's // Meth. Enzymol.—1971.—20.—P. 55—70.
10. Hamburger A. D., De Groot N., Lapidot Y. Peptidyl-tRNA. II. The chemical synthesis of phenylalanine-containing oligopeptidyl-tRNA // Biochim. et biophys. acta.—1970.—213, N 1.—P. 115—123.
11. Nirenberg M., Leder P. RNA codewords and protein synthesis. The effect of trinucleotides upon the binding of sRNA to ribosomes // Science.—1964.—145, N 3639.—P. 1399—1407.
12. Factor-free («Non-enzymic») and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes / L. P. Gavrilova, O. E. Kostyashkina, V. E. Koteliansky, A. S. Spirin // J. Mol. Biol.—1976.—101, N 4.—P. 537—552.
13. Tapio S., Kurland C. G. Mutant *EF-Tu* increases missense error *in vitro* // Mol. and Gen. Genet.—1986.—205, N 1.—P. 186—188.
14. Tapio S., Isaksson L. A. Antagonistic effects of mutant elongation factor *Tu* and ribosomal protein *S12* on control of translational accuracy, suppression and cellular growth // Biochimie.—1988.—70, N 2.—P. 273—281.
15. Gavrilova L. P., Perminova I. N., Spirin A. S. Elongation factor *Tu* can reduce translation errors in poly(U)-directed cell-free systems // J. Mol. Biol.—1981.—149, N 1.—P. 69—78.
16. Potapov A. P., Groisman I. S., El'skaya A. V. Correlation between poly(U) misreading and poly(dT) translation efficiency in *E. coli* cell-free systems // Biochimie.—1990.—72, N 5.—P. 345—349.
17. Hornig H., Woolley P., Lührmann R. Decoding at the ribosomal A site: antibiotics, misreading and energy of aminoacyl-tRNA binding // Ibid.—1987.—69, N 8.—P. 803—812.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 18.02.91