

Шапероноподібні властивості компонентів білоксинтезувальної системи

Т. О. Лукаш, Г. В. Турківська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

E. mail: luktan@yandex.ru

Розглянуто і проаналізовано роботи, присвячені дослідженню шапероноподібних властивостей рибосом та окремих білкових факторів трансляції. Крім участі у біосинтезі білка, про- і еукаріотні рибосоми, фактори елонгації EF1A, EF2, eEF1A та фактор ініціації IF2 здатні відновлювати активність частково денатурованих ферментів та захищати їх від денатурації. Передбачається, що завдяки шапероноподібним властивостям перелічені компоненти білоксинтезувальної системи можуть брати участь у фолдингу чи ренатурації білків та підтримувати їхню продуктивну конформацію у цитоплазмі клітин.

Ключові слова: молекулярні шаперони, фолдинг, білоксинтезувальна система, рибосоми, білкові фактори трансляції.

Вступ. Небезпека неправильного фолдингу і агрегації білків є особливою проблемою для живої клітини. Вирішенню цієї проблеми сприяє присутність молекулярних шаперонів, які беруть участь у численних процесах у клітині, серед них фолдинг новосинтезованих поліпептидів як упродовж, так і після трансляції, формування їхньої олігомерної структури та утворення мультимолекулярних комплексів, а також участь у секреції білків [1—4].

Молекулярні шаперони залучені до захисту клітин від пошкоджених білків завдяки своїй здатності зв'язувати ці білки, здійснювати їхній рефолдинг або прискорювати їхню деградацію. Таким чином, вони відіграють ключову роль у встановленні балансу в клітині між рефолдингом білків та їхньою протеолітичною деградацією [5].

Так, показано, що компоненти білоксинтезувальної системи, зокрема, рибосоми і деякі білкові

фактори трансляції подібно до молекулярних шаперонів можуть захищати білки від теплової денатурації, формувати комплекси з пошкодженими білками та брати участь у їхньому рефолдингу.

Шапероноподібні властивості рибосом. Котрансляційний фолдинг білків продемонстровано в багатьох експериментах як *in vivo*, так і в безклітинних білоксинтезувальних системах [6—11]. Такі експерименти показали, що формування просторової структури білків починається на стадії їхнього синтезу і відбувається в основному на рибосомі. Поліпептиди, які синтезуються на рибосомах як пептидил-тРНК, можуть проявляти ферментативну активність, подібну до зрілого білка, зв'язувати специфічні конформаційні антитіла, формувати правильні дисульфідні зв'язки, існуючі в нативному білку.

При котрансляційному фолдингу поліпептидні ланцюги, що синтезуються, взаємодіють з іншими білками, такими як шаперони, шапероніни, оксидоредуктази тощо.

Висловлено думку, що рибосоми — місце синтезу білка — можуть самі функціонувати подібно до молекулярних шаперонів, створюючи захисне середовище, у якому новосинтезовані пептиди захищені від агрегації і деградації та в якому формується їхня просторова структура.

Дослідження структури прокаріотної рибосоми виявило існування тунелю, по якому просуваються всі новосинтезовані поліпептиди перед виходом з рибосоми [9—11]. Постають два важливих питання відносно функціонування цього тунелю. Чи згортаються в якійсь мірі білки у цьому тунелі через можливі шапероноподібні властивості рибосоми? Чому новосинтезовані білки при їхньому проходженні через тунель не прилипають до його стінок? Точно визначено всі параметри самого тунелю. Протяжність його від сайту синтезу до вихідного сайту становить 100 Å, що цілком узгоджується з довжиною новосинтезованого поліпептиду, який захищається від протеолітичного розщеплення, та мінімумом довжини, необхідної для розпізнавання антитілами на виході. Через те, що найменший отвір, через який поліпептид може проходити, близький до діаметра α -спіралі, автори вважають імовірним формування на рибосомі лише α -спіралі. Щодо структури стінок тунелю, то дослідники дійшли висновку, що хоча рибосомний тунель складається переважно з РНК, природа його поверхні нагадує поверхню шапероніну GroEL у його незв'язувальній конфорації.

Результати експериментальних досліджень показали, що тунель у рибосомі не є пасивним шляхом чи доріжкою для поліпептидного ланцюга, який синтезується. Використання методу перенесення енергії флуоресцентного резонансу (fluorescence resonance energy transfer) дало можливість виявити диференційований фолдинг новосинтезованих поліпептидів усередині рибосомного тунелю. Ці дослідження показали, що одні білки, як, наприклад, новосинтезований секреторний білок олігосахарилтрансфераза, повністю розгорнуті або витягнуті всередині рибосомного тунелю. Однак інші білки, як, зокрема, неполярні TMS (transmembrane sequences) — трансмембранні послідовності новосинтезованого мембранного білка — склалися в α -спіраль при його проходженні через рибосомний тунель. Такий фолдинг індукований і стабілізований рибосомами, оскільки новосинтезований ланцюг TMS не здатний підтримувати таку конфор-

мацію за межами рибосоми. Рибосома може виявляти TMS у новосинтезованих ланцюгах і сприяти їхньому фолдингу в тунелі [10—12].

Безперечними доказами того, що рибосоми виконують подібні до шаперонів функції, стали роботи, де показано, що рибосоми можуть здійснювати рефолдинг частково денатурованих ферментів. Так, бактеріальні рибосоми здатні відновлювати активність денатурованих у присутності гуанідинхлориду ферментів — глюкозо-6-фосфатдегідрогенази [13] і лактатдегідрогенази [14, 15]. Визначено, що активність у рефолдингу демонструють як 70S рибосоми, так і 50S субчастинки, а також 23S рРНК *Escherichia coli*. 30S субчастинки і 16S рРНК не проявляють подібної активності. Для 23S рРНК важливою була її третинна конформація, а 50S субчастинки виявляли більшу активність у рефолдингу, ніж цілі 70S рибосоми. На відміну від більшості відомих молекулярних шаперонів активність рибосом у білковому рефолдингу не залежала від додавання АТФ.

У роботі, де досліджували вплив рибосом *E. coli* на рефолдинг денатурованої 8 М сечовиною роданази [16], в основному підтверджено наведені вище результати. Показано, що рефолдинг денатурованої роданази проходить ефективно у присутності рибосом без додавання молекулярних шаперонів і АТФ. Здатність рибосом здійснювати ренатурацію роданази також пов'язана з властивостями 50S субчастинки рибосом і особливо її 23S рРНК.

Встановлено, що відносно ренатурації самі рибосоми можуть перебувати у двох взаємно перехідних станах — активному або неактивному. Неактивні рибосоми активували для фолдингу за допомогою фактора елонгації EF2 з додаванням GTP або розщепленням петлі її 23S рРНК α -сарцином. Показано, що нативна структура рибосом є обов'язковою для проявлення їхньої активності в білковому фолдингу, при цьому денатуровані прогріванням рибосоми втрачали таку активність.

Досліджено вплив на рибосомну активність у рефолдингу певних антибіотиків, які впливають на трансляцію. Спарсоміцин та хлорамфенікол, які зв'язуються з 50S субчастинкою, пригнічували рефолдинг. Інші антибіотики, такі як едеїн, інгібітор ініціації пептидного синтезу, та стрептоміцин, що зв'язується з 30S, не показали явного впливу на опосередкований рибосомами рефолдинг денатурованої роданази. Отримані результати свідчать про

те, що білковий фолдинг є специфічною функцією рибосом, зокрема, їхніх 50S субчастинок.

Менше досліджено активність у білковому фолдингу еукаріотних рибосом, хоча показано, що така активність також властива 80S рибосомам зародків пшениці і печінки щурів [15].

Важливим критерієм для вибору ферментів у попередніх експериментах, де досліджували їхній рефолдинг з частково денатурованого стану в присутності рибосом, була наявність простого, швидкого і точного методу визначення активності цих ензимів. У зазначених роботах активність ферменту використовували як міру успішного рефолдингу білка в його нативну конформацію. У нашій лабораторії вивчали вплив рибосом вищих еукаріотів на активність гомологічних аміноацил-тРНК синтетаз (АРСаз).

Відомо, що в клітинах вищих еукаріотів частина АРСаз існує в складі високомолекулярного комплексу, крім того, АРСзи знайдено співлокалізованими або асоційованими з полірибосомами [17—19]. Вважається, що таку можливість забезпечує афінність еукаріотних АРСаз до високомолекулярної рРНК. Асоціація АРСаз з полірибосомами досить лабільна і змінюється залежно від функціонального або патологічного станів, які різняться за інтенсивністю білкового синтезу в еукаріотних клітинах. З іншого боку, АРСazi ссавців — це досить лабільні білки, чутливі до свого макромолекулярного оточення. Ці ферменти можуть частково втрачати свою активність вже протягом очищення або при тривалому зберіганні. Нами досліджено вплив еукаріотних рибосом на активність частково денатурованих лейцил-тРНК (LeuRS) та ізолейцил-тРНК синтетаз (IleRS) у складі високомолекулярного комплексу [20, 21]. Показано, що як цілі 80S рибосоми, так і їхні окремі 60S та 40S субчастинки здатні стимулювати активність LeuRS і IleRS, хоч сила їхнього впливу трохи різниться. Найменш виражений ефект спостерігали у присутності 40S субчастинок.

Детально вивчено вплив рибосом на кінетичні параметри реакції аміноацилювання тРНК, яка каталізується LeuRS. При додаванні рибосом спостерігали збільшення співвідношення V_{\max}/K_m , яке є важливим критерієм ефективності реакції аміноацилювання. Остаточний висновок стосовно дії рибосом на частково денатурований фермент зроблено на підставі результатів визначення коефіцієнта

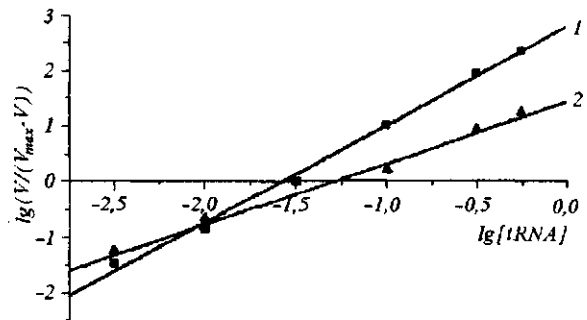


Рис. 1. Графіки Хілла для синтезу лейцил-тРНК, що каталізується лейцил-тРНК синтетазою за присутності 80S рибосом (1) та без додавання рибосом (2)

Хілла, значення якого зростало в присутності рибосом, що свідчило про підсилення позитивної кооперативності двох центрів зв'язування тРНК на LeuRS і, як наслідок, про підвищення каталітичної активності ферменту (рис. 1).

Для перевірки специфічності стимулювальної дії рибосом здійснено серію контрольних експериментів. Замість рибосом до інкубаційної суміші для аміноацилювання додавали рибосомні білки, рРНК або бичачий сироватковий альбумін (БСА) у концентраціях, рівних концентрації рибосом. Ніякого впливу цих молекул на активність АРСаз за даних умов не виявлено. Проаналізовано всі можливі механізми стимулювального впливу рибосом [20, 21]. Зроблено висновок, що зростання активності частково денатурованого ферменту в присутності рибосом може бути результатом відновлення його активної конформації і, отже, рибосоми виконують функцію, подібну до молекулярних шаперонів.

Можливість стабілізації нативної конформації ферменту в присутності рибосом перевіряли в експериментах, де досліджували вплив рибосом на термостабільність LeuRS [22]. Визначено константи інактивації LeuRS при її прогріванні у присутності і без рибосом. Встановлено, що рибосоми захищають фермент від термоінактивації, тоді як вплив рРНК і суміші рибосомних білків був значно меншим (так само, як і БСА). Ці дані дають підставу виключити неспецифічний вплив рибосом та їхніх субчастинок на LeuRS, а також свідчать про необхідність їхньої нативної структури для стабілізації ферменту.

Особливий інтерес становило дослідження шапероноподібної функції рибосом в експериментах з використанням високоочищеної фенілаланіл-тРНК синтетази (PheRS), яка вирізняється з-поміж інших своєю тетрамерною структурою ($\alpha_2\beta_2$) та високою спорідненістю до рибосом, крім того, вона не входить до складу високомолекулярного комплексу АРСаз [19].

При використанні ферменту безпосередньо після його одержання та за умов, що забезпечують його нативну структуру, ніякого впливу рибосом на його активність не спостерігали. Для одержання частково денатурованої PheRS нативний концентрований фермент розводили до низьких концентрацій буфером без додавання БСА і прогрівали. Додавання рибосом до частково денатурованого ферменту майже повністю відновлювало його активність [21]. Показано також здатність рибосом в умовах денатурації підтримувати активну конформацію PheRS. Повна активність ферменту зберігалася при додаванні рибосом у буфер для розведення ферменту, у той час як БСА за тих же концентрацій не виявляв подібного ефекту. Велика різниця в концентраціях БСА та рибосом, необхідних для підтримки активної конформації ферменту, також свідчить про специфічність захисної дії рибосом [21].

Шапероноподібні властивості факторів елонгації та ініціації. Відомо, що білкові фактори трансляції виконують важливі функції в біосинтезі білка на рибосомах. Фактори елонгації так само, як фактори ініціації та їхні функції, досліджуються вже досить давно. Показано, що, крім своєї ролі в трансляції, ці фактори беруть участь в інших біологічних процесах [23—25]. Ми зупинемося безпосередньо лише на шапероноподібних властивостях факторів елонгації та ініціації. Зокрема, еукаріотний фактор елонгації трансляції 1A (eEF1A), кількість якого в клітинах перевищує в молярному співвідношенні усі інші важливі білки компонентів апарату трансляції, здатний контролювати агрегацію мультимерних білків. eEF1A може зв'язуватися з актиновими філаментами і мікротрубочками, впливаючи таким чином на збирання (assembly) і стабільність полімерів цитоскелету [24, 25]. Це нагадує властивості молекулярних шаперонів, зокрема, їхню здатність впливати на агрегацію білків або утворення мультимолекулярних комплексів.

Доцільно нагадати, що бактеріальний фактор елонгації трансляції EF1A (EF-Tu за старою класифікацією), як і його еукаріотний аналог eEF1A, каталізує кодон-специфічне зв'язування аміноацил-тРНК з А сайтом рибосоми. Як про-, так і еукаріотний фактор елонгації трансляції зв'язує GTP або GDP, утворює потрійний комплекс фактор*GTP*аміноацил-тРНК, підсилює зв'язування аміноацил-тРНК з А сайтом рибосоми і гідролізує GTP. Однак, згідно з результатами нещодавно опублікованих робіт, у функціонуванні цих факторів є певні відмінності. Наприклад, спорідненість прокаріотного EF1A до GDP на два порядки вища, ніж до GTP. В еукаріотного фактора така підвищена спорідненість до GDP зникає. Крім того, помічено значні відмінності в конформації GTP- і GDP-зв'язаних форм прокаріотного фактора 1A. Таким чином, однакова спорідненість еукаріотного фактора до GTP та GDP може свідчити про відсутність суттєвих конформаційних відмінностей цих двох форм фактора. Такі відмінності про- та еукаріотних факторів можуть бути важливими для інтерпретації особливостей їхнього функціонування і, зокрема, як шаперонів.

Рефолдинг денатурованої роданази широко використовували для вивчення білкового фолдингу протягом багатьох років. Головна причина — простий і чутливий метод визначення її ферментативної активності. Показано, що EF1A має шапероноподібну властивість підсилювати рефолдинг частково денатурованої роданази [26]. Ренатурація ферменту в присутності фактора не залежала від додавання АТР. Активність у рефолдингу була найвираженішою за умов динамічної рівноваги фактора між відкритою і закритою конформаціями, які індукувалися відповідно GDP і GTP. Осциляція відбувається при гідролізі GTP і наступному заміщенні його GDP. У той самий час ренатурація роданази фактором EF1A помітно підсилювалася в присутності EF1B, який каталізує обмін GDP на GTP у EF1A. Однак ренатурація зменшувалася за умов, які стабілізували як відкриту, так і закриту форми фактора. Додавання GDP також пригнічувало ренатурацію. Автори вважають, що гнучкість (flexing) конформації EF1A є важливим фактором для прояву його шапероноподібної активності у рефолдингу.

У роботі, де вивчали вплив прокаріотного фактора EF1A на активність частково денатурованих

цитратсинтази і α -глюкозидази [27], також продемонстровано подібні до молекулярних шаперонів властивості фактора. Показано стимуляцію білкової ренатурації у тій самій мірі та приблизно за тих же концентрацій, які мало відрізнялися від одержаних з шаперонами DnaK, HSP90 і smHSPs. У цій же роботі виявлено здатність EF1A захищати цитратсинтазу від агрегації в умовах теплового шоку.

Крім того, фактор елонгації EF1A може взаємодіяти з розгорнутим інгібітором трипсину підшлункової залози бика — BPTI (unfolded bovine pancreatic trypsin inhibitor), але такої взаємодії з нативним інгібітором не спостерігали. Тобто показано здатність розрізнити денатурований і нативний білок [27]. Фактор елонгації має сайт зв'язування амінокислоти, через який він взаємодіє з аміноацил-тРНК. Цікаво, що аміноацил-тРНК з гідрофобною амінокислотою зв'язується сильніше з фактором, ніж з аміноацил-тРНК, яка містить амінокислоту з полярними групами. Передбачається, що цей сайт віддає перевагу взаємодії з гідрофобними амінокислотами подібно до шаперонів. Автори вважають, що відбувається гідрофобна взаємодія між EF1A та розгорнутими білками і що сайт, про який згадувалося вище, може бути частково залучений до такої взаємодії.

Показана в експериментах *in vitro* взаємодія між EF1A і розгорнутими білками дає підставу стверджувати, що вона можлива також *in vivo* в процесі білкового фолдингу та за умов теплового шоку. Велика кількість молекул EF1A, присутня в цитоплазмі та біля цитоплазматичних мембран, може утворювати резервуар шапероноподібних молекул, які відіграють роль своєрідного шаперонного буфера для попередження агрегації ненативних або розгорнутих білків.

Крім згаданих вище робіт, є свідчення того, що фактор елонгації трансляції EF1A хлоропластів рослин також може бути причетний до розвитку їхньої термотолерантності, діючи як молекулярний шаперон, який захищає білки від термоагрегації та інактивації [28, 29]. Через те, що спосіб функціонування факторів елонгації як шаперонів подібний до деяких smHSPs (Small Heat Shock Proteins), доцільно детальніше розглянути особливості механізмів дії останніх.

Рослини синтезують велику кількість smHSPs. На противагу smHSP ссавців, рослинні smHSP утворюють значно більшу групу білків, які синте-

зуються у відповідь на тепловий стрес. Наприклад, більш ніж 25 індивідуальних smHSP можна спостерігати у різних рослин, що потерпали від теплового стресу. Лише один клас smHSP ідентифіковано у людини, миші та дріжджів і він локалізується в цитозолі. У рослин визначено принаймні чотири великих класи smHSP, з них два знайдено в цитозолі, один — у хлоропластах і ще один — в ендоплазматичному ретикулумі. Рослинні smHSP виявлено також у мітохондріях. Показано, що smHSP *in vitro* демонструють шаперонну активність [30].

На противагу ATP-залежним молекулярним шаперонам HSP60 і HSP70 класів smHSPs здатні здійснювати рефолдинг хімічно денатурованих білків в ATP-незалежний спосіб.

Тим часом показано, що до розвитку термотолерантності рослин, наприклад кукурудзи, причетний фактор елонгації трансляції із хлоропластів EF1A [28]. Так, теплостійкий сорт кукурудзи синтезує унікальний набір із п'яти поліпептидів теплового шоку розміром 45 кДа. Вважається, що вони можуть відігравати важливу роль у розвитку термотолерантності кукурудзи. Виявилось, що з п'яти виділених HSPs три мали амінокислотну послідовність, подібну до хлоропластного фактора елонгації, а також до прокариотного фактора елонгації трансляції EF1A. Останній, як уже зазначалося, може функціонувати як молекулярний шаперон та захищати білки від термоденатурації [26, 27]. Доказами щодо ролі EF1A хлоропластів у розвитку термотолерантності кукурудзи були дані про позитивну кореляцію між термоіндукованою акумуляцією EF1A і здатністю рослин витримувати тепловий стрес у різних генотипах кукурудзи, про зв'язок між синтезом EF1A, індукованим теплом, і теплостійким фенотипом кукурудзи, про збільшення стійкості до теплового стресу в *E. coli*, де експресується EF1A кукурудзи, та про зростання термостабільності хлоропластних білків кукурудзи при підвищеному рівні EF1A.

Автори пропонують гіпотезу стосовно того, що EF1A забезпечує термотолерантність за рахунок своєї дії як молекулярного шаперону і завдяки захисту термолабільних білків від термоагрегації та інактивації. Нещодавно було досліджено вплив рекомбінантного попередника EF1A хлоропластів кукурудзи (pre-EF1A) на термоагрегацію та інактивацію термолабільних білків [30]. Pre-EF1A має

на N-кінці послідовність довжиною 58 амінокислотних залишків, необхідну для транспорту фактора в хлоропласти.

В експериментах *in vitro* показано, що цей рекомбінантний pre-EF1A кукурудзи виявляє шаперонну активність. Він захищає цитратсинтазу і малатдегідрогеназу від термоагрегації та інактивації. Механізм функціонування рекомбінантного pre-EF1A, хоча й не цілком, але подібний до деяких рослинних smHSPs. Наприклад, HSP17.7 і HSP18.1 здатні запобігати агрегації та інактивації за високотемпературних стресів при відсутності інших шаперонів і ATP [28]. Так само рекомбінантний pre-EF1A, ефективний в захисті термолабільних білків, не потребує їхньої присутності. Наведені вище дані свідчать на користь твердження, що EF1A кукурудзи бере участь у розвитку термотолерантності, діючи як молекулярний шаперон і захищаючи хлоропластні білки від термального пошкодження.

Відкриття шапероноподібних властивостей першого фактора елонгації трансляції спонукало дослідників перевірити можливі шапероноподібні властивості фактора елонгації EF2 і фактора ініціації IF2 [31]. Фактор елонгації трансляції EF2 каталізує етап транслокації. EF2 зв'язується з рибосомою в його GTP формі, гідролізує GTP, ініціює переміщення тРНК і звільняється в GDP формі.

Фактор ініціації IF2 — єдиний G білок із трьох факторів ініціації *E. coli*. Він опосередковує зв'язування fMet-tRNA^{Met} на 30S рибосомній субодиниці, що обумовлює формування 30S ініціаторного комплексу. Формування 70S ініціаторного комплексу супроводжується IF2-залежним гідролізом GTP і вивільненням IF2 з 70S ініціаторного комплексу. Цей етап є важливим для формування першого пептидного зв'язку.

Доведено, що EF2 і IF2 підсилюють продуктивний фолдинг денатурованих цитратсинтази і α -глюкозидази у спосіб, подібний до молекулярних шаперонів, захищають білки від термоденатурації і утворюють комплекси з денатурованими білками [31]. GTP стимулював EF2- та IF2-залежну ренатурацію цитратсинтази за умов, коли ці фактори були в лімітуючих кількостях, що дозволяло припустити використання їхньої GTPазної активності для каталізу білкового фолдингу.

Фактор елонгації EF2 належить до GTPаз — надродина білків, функціональний цикл яких

включає принаймні чотири головні конформаційні форми: без нуклеотидів, комплекс з GDP, комплекс з GTP та GTPазний стан. Стимуляцію ренатурації цитратсинтази досліджували в присутності чотирьох перелічених форм EF2. Виявилось, що фактор без нуклеотидів та в комплексі з GDP був активнішим у ренатурації цитратсинтази, ніж GTP форма фактора.

Як уже згадувалося, комплекс EF1A*GDP також був активнішим у стимуляції білкової ренатурації, ніж EF1A*GTP [31]. Однак коли концентрацію EF2 знижували в 20 разів (до 0,1 мкМ при ренатурації 0,1 мкМ цитратсинтази), вищий рівень стимуляції ренатурації цитратсинтази спостерігався у присутності GTP. За цих умов сам GTP не спричиняв стимуляції ренатурації цитратсинтази. Автори вважають, що GTPазна активність EF2 може стимулювати його шаперонну активність і така стимуляція виявляється, коли EF2 додається в лімітуючих кількостях. При дослідженні стимуляції EF2-залежної ренатурації цитратсинтази показано, що GTPазна активність EF2 може стимулюватися взаємодією з розгорнутими білками. R-CMLA (reduced carboxymethyl α -lactalbumin) — перманентно розгорнутий білок, що зберігає розгорнуту конформацію без стабільної вторинної структури за відсутності денатурантів. Згаданий білок взаємодіє з шаперонами, а також стимулює їхню ATPазну активність. Показано, що R-CMLA у 10 разів підвищував GTPазну активність EF2. Такий ефект подібний до стимуляції розгорнутим білком ATPази DnaK.

Так само, як EF2, рефолдинг цитратсинтази підсилює фактор ініціації IF2 (необхідні концентрації IF2 нижчі, ніж EF2). Подібно до EF2, фактор ініціації захищає цитратсинтазу від незворотної агрегації при тепловому стресі. Цікаво, що концентрації факторів, необхідні для цього захисту, близькі до таких для DnaK і smHSPs. Контрольні білки, зокрема, БСА, овальбумін або лізоцим, не проявляли схожого впливу.

Досліджено взаємодію IF2 з розгорнутими білками, серед яких BPTI і R-CMLA. Фактор ініціації, подібно до EF2 і молекулярних шаперонів, надає перевагу взаємодії з розгорнутою формою білків. EF2 і IF2 взаємодіють з розгорнутим BPTI, але не взаємодіють з цим білком у нативній конформації. EF2*GDP виявляє більшу активність у зв'язуванні розгорнутих білків, ніж EF2*GTP. Необхідно за-

значити, що перехід EF2*GTP у EF2*GDP супроводжується посиленням зв'язування гідрофобного флуоресцентного зонда ANS (anilino-naphthalene-sulfate). Через це вважають, що EF2*GDP експонує гідрофобну поверхню, яка може взаємодіяти з розгорнутими білками.

Одержані результати не ілюструють взаємодії EF2 або IF2 з новосинтезованим ланцюгом при трансляції. Однак цікаво, що EF2 є компонентом 4.5S РНК комплексу, який діє як шаперон для деяких новосинтезованих білків.

Іншими авторами виявлено, що EF2 сам не здатний каталізувати ренатурацію роданази, але може стимулювати її в присутності GTP і рибосом [16]. Але оскільки EF2 специфічно взаємодіє з розгорнутими білками цитратсинтазою і α -глюкозидазою, а також із R-CMLA та розгорнутим ВРТ1, подібно до класичних шаперонів, наведені вище результати дають підставу вважати, що й сам фактор EF2 може проявляти шапероноподібні властивості.

Значно менше існує свідчень про шапероноподібні властивості білкових факторів трансляції ссавців.

Нещодавно показано, що eEF1A із ретикулоцитів кроля може взаємодіяти з новосинтезованими поліпептидами, а також стимулювати рефолдинг денатурованої люциферази [32]. Цікаво, що для еукаріотного фактора елонгації eEF1A також показано можливість взаємодії з білками, не здатними коректно складатися в цитозольному оточенні [32].

У роботах нашої лабораторії вивчали можливі шапероноподібні властивості фактора елонгації eEF1A з печінки кролів, а саме — досліджували його здатність стабілізувати та відновлювати продуктивну конформацію АРСаз [33, 34]. Можливість взаємодії фактора елонгації та АРСаз продемонстровано в попередніх роботах лабораторії, де показано існування *in vitro* неканонічних четвертинних комплексів [eEF1A*GDP*tRNA^{Phe}*PheRS] і [eEF1A*GDP*tRNA^{Ser}*SerRS], до складу яких входять фактор елонгації і фенілаланіл- або серил-тРНК синтетази (SerRS) [35—37].

З іншого боку, як уже згадувалося, АРСаз ссавців — це дуже лабільні білки, чутливі до свого макромолекулярного оточення. У високоочищеному стані вони можуть частково втрачати свою активність при розведенні до низьких концентрацій

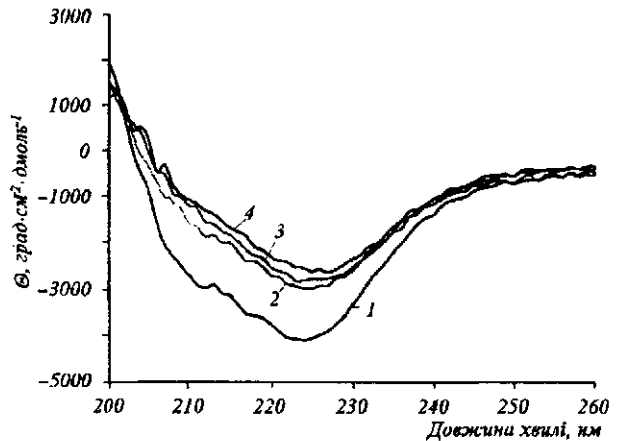


Рис. 2. Спектри кругового дихроїзму фенілаланіл-тРНК синтетази (0,1 мг/мл) у далекій ультрафіолетовій області за температури: 1, 2 — 4 °C перед і після прогрівання відповідно; 3—5 — 42 °C протягом 10 (3) і 20 хв (4). Після інкубації (42 °C, 10 хв) вміст α -спіралей зменшився на 20 %, β -структур — на 5 %

буфером, який не містить стабілізуючих білків, наприклад БСА. Показано, що димерні АРСазі, такі як лейцил-тРНК синтетаза зародків пшениці [38], триптофаніл-тРНК синтетаза підшлункової залози бика [39] і гліцил-тРНК синтетаза *Bombyx mori* [40, 41], можуть дисоціювати на субодиниці за певних низьких концентрацій білка. Така дисоціація супроводжується частковою втратою ферментативної активності.

Для денатурації PheRS у нашій роботі високоочищений препарат ферменту розводили до низьких концентрацій та додатково прогрівали за температури 42 °C. Методами динамічного світлорозсіювання, кругового дихроїзму та електрофорезу досліджували конформаційні зміни в молекулах PheRS, які призводили до часткової втрати ферментативної активності за зазначених умов денатурації. Одержані результати свідчать про те, що при розведенні до низьких концентрацій та наступному прогріванні в молекулі PheRS відбуваються незначне руйнування вторинної структури, що спричинює зміну поверхневого заряду молекули, та дисоціація на субодиниці. Також показано, що в присутності фактора елонгації eEF1A розпаду чи дисоціації PheRS на субодиниці не спостерігається (рис. 2). Ці дані збігаються з результатами експериментів, у яких виявлено, що при застосуванні згаданої схеми денатурації у присутності фактора елонгації ак-

тивність ферменту повністю зберігалася. Концентрація фактора елонгації при цьому була значно меншою, ніж концентрація БСА, необхідна для подібного ефекту. Тобто можна стверджувати, що eEF1A здатний підтримувати продуктивну конформацію PheRS в умовах денатурації і що цей ефект відрізняється від неспецифічного стабілізуючого впливу БСА.

Крім здатності фактора елонгації стабілізувати нативну конформацію ферменту в умовах денатурації, показано, що в присутності eEF1A активність частково денатурованої PheRS повністю відновлювалася. Потрібно зазначити, що така реактивація ферменту відбувається при молярному співвідношенні APC до eEF1A, близькому до існуючого в еукаріотній клітині. На відміну від прокариотного фактора елонгації трансляції [26, 27] eEF1A*GDP і eEF1A*GTP комплекси еукаріотного фактора проявили однакову здатність відновлювати активність ферменту. Це можна пояснити тим, що, як уже згадувалося, конформаційні відмінності GDP- та GTP-зв'язаних форм еукаріотного фактора є менш вираженими порівняно з прокариотними.

Встановлено також, що шапероноподібні властивості еукаріотного фактора елонгації трансляції eEF1A не обмежуються його взаємодією з PheRS. За присутності фактора елонгації eEF1A також спостерігалася повне відновлення активності частково денатурованої SerRS. Як і в експериментах з PheRS, показано специфічність дії фактора, зокрема, у присутності БСА за тих же концентрацій, що й eEF1A, реактивації ферменту не відмічено.

Шапероноподібні властивості рибосом і факторів елонгації свідчать на користь гіпотези котрансляційного фолдингу новосинтезованих білків та про можливу участь у цьому процесі рибосом і факторів елонгації [8—11]. Цю гіпотезу підтверджують також дані про взаємодію еукаріотного фактора елонгації 1A з новосинтезованими поліпептидами [32].

Встановлено, що eEF1A зв'язується з дистальним від пептидилтрансферазного центра кінцем новосинтезованого ланцюга. Це продемонстровано для багатьох новосинтезованих ланцюгів різної довжини і послідовності. Важливо підкреслити, що фактор елонгації може зв'язувати лише розгорнуті білки і не може зв'язувати ці ж білки, вже коректно згорнуті. Отже, завдяки своїм шапероноподібним властивостям фактор елонгації eEF1A здат-

ний попереджати агрегацію новосинтезованих поліпептидів.

З іншого боку, значна частина новосинтезованих білків котрансляційно знищується. Новосинтезовані, але пошкоджені білки можуть приєднувати убіквітин, коли вони ще зв'язані з рибосомами. Тут можна говорити про зв'язок між білковим синтезом та білковою деградацією. Однак на сьогодні мало відомо про механізми, які забезпечують упізнання неправильно укладених білків. Крім того, невідомо, у який спосіб пошкоджені новосинтезовані білки переносяться до протеасом. Оскільки eEF1A може зв'язувати новосинтезовані поліпептиди після їхнього звільнення з рибосом, припускається, що пошкоджені новосинтезовані поліпептидні ланцюги ескортуються до протеасом фактором елонгації разом з іншими регуляторними факторами [42]. Показано, що eEF1A може брати участь в убіквітин-залежній деградації N^α-ацетильованих білків [43].

Накопичилося досить доказів на користь того, що значну частину еукаріотних білків складають так звані слабоструктуровані або непорядковані білки, які в очищеному стані при нейтральних рН у розчині за відсутності специфічних лігандів, з якими вони можуть зв'язуватися, втрачають упорядковану структуру [44, 45]. Такі білки відомі ще як *natively unfolded* або *intrinsically unstructured*. Показано, що існування слабоструктурованих або непорядкованих білків більш властиве для еукаріотів, ніж для прокариотів [46]. Одним із пояснень цього може бути відсутність в останніх клітинних компартментів, що зменшує здатність прокариотних клітин фізично захищати незгорнуті структури від деградації. Більшість згаданих непорядкованих слабоструктурованих білків локалізовані в клітинних компартментах, що забезпечує їм певний захист. Слабоструктуровані білки можуть набувати відповідної конформації при взаємодії зі своїми специфічними макромолекулярними лігандами, такими як інші білки, нуклеїнові кислоти або мембрани.

Варте уваги й те, що слабоструктуровані білки залучені до деяких найважливіших регуляторних функцій еукаріотної клітини, зокрема, до контролю клітинного циклу, а також до регуляції транскрипції і трансляції. Можливо, що їхня непорядкованість забезпечує додатковий рівень швидкого регуляторного контролю в клітинах у відповідь на

зміну зовнішніх умов чи умов середовища. Враховуючи здатність деяких компонентів апарату трансляції, зокрема, рибосом і фактора елонгації eEF1A відновлювати активність частково денатурованих APCаз та беручи до уваги високий рівень компарменталізації апарату трансляції вищих еукаріотів, можна припустити, що в клітині слабоструктуровані (чи непорядковані) білки набувають нативної конформації не лише у присутності своїх специфічних лігандів (наприклад, тРНК субстрату для APC), а й за наявності рибосом або білкових факторів трансляції, які є складовими трансляційних компартментів.

Як уже зазначалося, аміноацил-тРНК синтетази ссавців здатні формувати високомолекулярні комплекси, які складаються принаймні з дев'яти APCаз та трьох білкових факторів (p43, p38 і p18) [16, 17]. Цікавим видається припущення, що компоненти цього комплексу, подібно до шаперонів, можуть брати участь у його біогенезі. Оскільки збиранню багатьох функціональних комплексів у клітині сприяють специфічні шаперони, передбачається, що останні причетні і до біогенезу мульти-APC комплексу. Про таку можливість свідчать і результати, які показали взаємодію HSP90 та аміноацил-тРНК синтетаз, компонентів мульти-APC комплексу [47]. Очевидно, HSP90 може бути посередником білково-білкових взаємодій аміноацил-тРНК синтетаз. Оскільки p38, один із білкових факторів макромолекулярного комплексу APCаз, проявляє гідрофобні властивості і взаємодіє з більшістю APCаз, які входять до його складу, вважається, що він відіграє роль своєрідного каркасу для збирання компонентів комплексу [48].

Висновки. У досліджах *in vitro* показано, що, крім своєї ролі в біосинтезі білка, рибосоми і деякі білкові фактори трансляції як про-, так і еукаріотів можуть виконувати функції, властиві молекулярним шаперонам. Вони здатні захищати білки від термоденатурації, підсилювати рефолдинг частково денатурованих білків, формувати комплекси з розгорнутими білками. Вважається, що рибосоми і білкові фактори трансляції можуть брати участь у фолдингу і ренатурації білків у цитоплазмі.

Шапероноподібні властивості рибосом і білкових факторів трансляції набувають особливого значення в клітинах вищих еукаріотів. Для цих клітин характерний високий рівень компарменталізації білоксинтезувального апарату і завдяки

згаданим властивостям рибосоми і фактори трансляції можуть забезпечувати підтримку продуктивної конформації компонентів білоксинтезувальної системи в трансляційних компартментах протягом послідовних циклів елонгації.

T. O. Lukash, H. V. Turkivska

Chaperone-like properties of the protein synthesis components

Summary

The review analyzes the results of research concerning chaperone-like properties of the ribosomes and translation factors. In addition to their role in the protein biosynthesis, pro- and eukaryotic ribosomes, elongation factors EF1A, eEF1A, EF2 and initiation factor IF2 are able to promote the reactivation of several partly denatured enzymes and protect them against denaturation. We conclude, that chaperone-like activity of the ribosomes and translational factors might be important for maintaining the enzymes activities in the cytoplasm.

Key words: molecular chaperone, folding, protein synthesis system, ribosomes, protein translation factors.

T. A. Лукаш, Г. В. Турковская

Шапероноподобные свойства компонентов белоксинтезирующей системы

Резюме

Рассмотрены и проанализированы работы, посвященные исследованию шапероноподобных свойств рибосом и отдельных белковых факторов трансляции. Кроме участия в биосинтезе белка, как про-, так и эукариотные рибосомы, факторы элонгации EF1A, EF2, eEF1A и фактор инициации IF2 способны восстанавливать активность частично денатурированных ферментов и защищать их от денатурации. Предполагается, что благодаря шапероноподобным свойствам перечисленные компоненты белоксинтезирующей системы могут участвовать в фолдинге или ренатурации белков и поддерживать их продуктивную конформацию в цитоплазме клеток.

Ключевые слова: молекулярные шапероны, фолдинг, белоксинтезирующая система, рибосомы, белковые факторы трансляции.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hendrick J. P., Hartl F.-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // *Annu. Rev. Biochem.*—1993.—62.—P. 349—384.
2. Dobson C. M., Ptitsyn O. B. Folding and binding. The biological consequences of physical principles // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1999.—9.—P. 89—91.
3. Ellis R. J., Hartl F.-U. Principles of protein folding in the cellular environment // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1999.—9.—P. 102—110.
4. Fink A. L. Chaperone-mediated protein folding // *Physiol. Revs.*—1999.—79.—P. 425—449.
5. Wickner S., Maurizi M. R., Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins // *Science.*—1999.—286.—P. 1888—1893.
6. Fedorov A. N., Friguet B., Djavadi-Ohanian L., Alakhov Y. B., Goldberg M. E. Folding on the ribosome of *Escherichia coli*

- tryptophan synthase β subunit nascent chains probed with a conformation-dependent monoclonal antibody // *J. Mol. Biol.*—1992.—228.—P. 351—358.
7. Kudlicki W., Odom O. W., Kramer G., Hardesty B. Activation and release of enzymatically inactive, full-length rhodanese that is bound to ribosomes as peptidyl-tRNA // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 16549—16553.
 8. Fedorov A. N., Baldwin T. O. Cotranslational protein folding // *J. Biol. Chem.*—1997.—272.—P. 32715—32718.
 9. Hardesty B., Tsalkova T., Kramer G. Co-translational folding // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1999.—9.—P. 111—114.
 10. Johnson A. E. The co-translational folding and interactions of nascent protein chains: a new approach using fluorescence resonance energy transfer // *FEBS Lett.*—2005.—579.—P. 916—920.
 11. Baram D., Yonath A. From peptide-bond formation to cotranslational folding: dynamic, regulatory and evolutionary aspects // *FEBS Lett.*—2005.—579.—P. 948—954.
 12. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A. Structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis // *Science.*—2000.—289.—P. 920—929.
 13. Das B., Chattopadhyay S., Dasgupta C. Reactivation of denatured fungal glucose-6-phosphate dehydrogenase and *E. coli* alkaline phosphatase with *E. coli* ribosomes // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1992.—183.—P. 774—780.
 14. Chattopadhyay S., Das B., Bera A. K., Dasgupta D., Dasgupta C. Refolding of denatured lactate dehydrogenase by *Escherichia coli* ribosomes // *Biochem. J.*—1994.—300.—P. 717—721.
 15. Das B., Chattopadhyay S., Bera A. K., Dasgupta C. *In vitro* protein folding by ribosomes from *Escherichia coli*, wheat germ and rat liver. The role of the 50S particle and its 23S rRNA // *Eur. J. Biochem.*—1996.—235.—P. 613—621.
 16. Kudlicki W., Coffman A., Kramer G., Hardesty B. Ribosomes and ribosomal RNA as chaperones for folding of proteins // *Folding and Design.*—1997.—2.—P. 101—108.
 17. Иванов Л. Л., Коваленко М. И., Турковская Г. В., Ельская А. В. Структурно-функциональные особенности эукариотических аминоацил-тРНК синтетаз // *Биохимия.*—1992.—57, № 8.—С. 1123—1141.
 18. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: Structural domains and their implications // *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.*—1991.—40.—P. 95—141.
 19. Pailiez J.-P., Waller J.-P. Phenylalanyl-tRNA synthetases from sheep liver and yeast. Correlation between net charge and binding to ribosomes // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 15491—15496.
 20. Turkovskaya H. V., Belyanskaya L. L., Kovalenko M. I., El'skaya A. V. Renaturation of rabbit liver aminoacyl-tRNA synthetases by 80S ribosomes // *Int. J. Biochem. and Cell Biol.*—1999.—31.—P. 759—768.
 21. Лукаш Т. О., Турківська Г. В., Ельська Г. В. Відновлення активності аміноацил-тРНК синтетаз вищих еукариотів та їхня стабілізація в присутності рибосом // *Біополімери і клітина.*—2004.—20, № 4.—С. 316—320.
 22. Сана Сара, Иванов Л. Л., Турковская Г. В., Мартинкус З. П., Коваленко М. И., Ельская А. В. Влияние рибосом на термостабильность аміноацил-тРНК синтетаз // *Биополімери и клетка.*—1992.—8, № 3.—P. 6—9.
 23. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1 α : structure expression, functions and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*—1998.—60.—P. 47—78.
 24. Yang F., Demma M., Warren V., Dharmawardhane S., Condeelis J. Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1 α // *Nature.*—1990.—347.—P. 494—496.
 25. Shiina N., Gotoh Y., Kubomura N., Iwamatsu A., Nishida E. Microtubule severing by elongation factor 1 α // *Science.*—1994.—266.—P. 282—285.
 26. Kudlicki W., Coffman A., Kramer G., Hardesty B. Renaturation of rhodanese by translational elongation factor EF-Tu // *J. Biol. Chem.*—1997.—272.—P. 32206—32210.
 27. Caldas T. D., Yaagoubis A. E., Richarme G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 11478—11482.
 28. Lee G. J., Pokala N., Vierling E. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from Pea // *J. Biol. Chem.*—1995.—270.—P. 10432—10438.
 29. Bhadula S. K., Elthon T. E., Habben J. E., Helentjaris T. G., Jiao S., Ristic Z. Heat-stress induced synthesis of chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) in a heat-tolerant maize line // *Planta.*—2001.—212.—P. 359—366.
 30. Rao D., Momcilovic I., Kobayashi S., Callegari E., Ristic Z. Chaperone activity of recombinant maize chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu // *Eur. J. Biochem.*—2004.—271.—P. 3684—3692.
 31. Caldas T. D., Laalami S., Richarme G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2 // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 855—860.
 32. Hotokezaka Y., Tobben U., Hotokezaka H., van Leyen K., Beatrix B., Smith D. H., Nakamura T., Wiedman M. Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides // *J. Biol. Chem.*—2002.—277.—P. 18545—18551.
 33. Лукаш Т. О., Турківська Г. В., Негруцький Б. С., Ельська Г. В. Ренагурація фенілаланіл-тРНК синтетаз фактором елонгації eEF1A // *Біополімери і клітина.*—2003.—19, № 4.—P. 350—354.
 34. Lukash T. O., Turkivska H. V., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Chaperone-like activity of mammalian elongation factor: renaturation of aminoacyl-tRNA synthetases // *Int. J. Biochem. and Cell Biol.*—2004.—36.—P. 1341—1347.
 35. Negrutskii B. S., Budkevich T. V., Shalakh 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.
 36. Petrushenko Z. M., Budkevich T. V., Shalakh 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.
 37. Футерник П. В., Погрібна А. П., Петрушенко З. М., Негруцький Б. С., Ельська Г. В. Дослідження комплексів фактора елонгації 1A з тРНК^{Ser} та серил-тРНК синтетазою // *Біополімери і клітина.*—2004.—20.—P. 17—23.
 38. Carias J.-R., Mouricout M., Quintard B., Thomas J.-C., Julie R. Leucyl-tRNA and arginyl-tRNA synthetases of wheat germ. Inactivation and ribosome effect // *Eur. J. Biochem.*—1978.—87.—P. 583—590.
 39. Iborra F., Dorizzi M., Labouesse J. Tryptophanyl-transfer ribonucleic acid synthetase from beef pancreas. Ligand binding and dissociation equilibrium between the active dimeric and inactive monomeric structures // *Eur. J. Biochem.*—1973.—39.—P. 275—282.
 40. Kern D., Giege R., Ebel J.-P. Glycyl-tRNA synthetase from

- baker's yeast. Interconversion between active and inactive forms of the enzyme // *Biochemistry*.—1981.—20.—P. 122—131.
41. Kawakami M., Nishio K. Subunit structure and tRNA-binding properties of *Bombyx mory* glycyl-tRNA synthetase // *J. Biochem.*—1985.—98.—P. 177—186.
42. Chuang S.-M., Chen Li, Lambertson D., Anand M., Kinzy T. G., Madura K. Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A // *Mol. and Cell Biol.*—2005.—25.—P. 403—413.
43. Gonen H., Smith C. E., Siegel N. R., Kahana C., Merrick W. C., Chakraburty K., Schwartz A. L., Ciechanover A. Protein synthesis elongation factor EF1 α is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N^{ac}-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 7648—7652.
44. Dunker A. K., Lawson J. D., Brown C. J., Williams R. M., Romero P., Oh J. S., Oldfield C. J., Campen A. M., Ratliff C. M., Higgs K. W., Ausio J., Nissen M. S., Reeves R., Kang C. H., Kissinger C. R., Bailey R. W., Griswold M. D., Chiu W., Garner E. C., Obradovic Z. Intrinsically disordered protein // *J. Mol. Graph. Modell.*—2001.—19.—P. 26—59.
45. Fink A. L. Natively unfolded proteins // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—2005.—15.—P. 35—41.
46. Ward J. J., Sodhi J. S., McGuffin L. J., Buxton B. F., Jones D. T. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life // *J. Mol. Biol.*—2004.—337.—P. 635—645.
47. Kang J., Kim T., Ko Y.-G., Rho S. B., Park S. G., Kim M. J., Kwon H. J., Kim S. Heat shock protein 90 mediates protein-protein interactions between human aminoacyl-tRNA synthetases // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 31682—31688.
48. Quevillon S., Robinson J.-C., Berthonneau E., Siatecka M., Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein // *J. Mol. Biol.*—1999.—285.—P. 183—195.

УДК 577.152:577.217
Надійшла до редакції 14.12.04