

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут молекулярної біології і генетики

УДК 57.085.23, 577.122.5, 577.217.535

Негруцький Борис Сергійович

Функціональна компартменталізація апарату білкового синтезу у вищих еукаріот

03.00.03 - молекулярна біологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ - 1999

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Науковий консультант:

доктор біологічних наук, професор, академік НАН України **Єльська Г.В.**

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, зав. відділом.

Офіційні опоненти:

докт.біол.наук, професор **Виноградова Р.П.**, кафедра біохімії Київського університету ім. Т.Г.Шевченка, професор

докт.біол.наук, ст.н.сотр. **Галкін А.П.**, завідувач відділу біоінженерії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

докт.біол.наук, ст.н.сотр. **Козлов Е.О.**, провідний науковий співробітник відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Провідна установа:

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м.Київ

Захист відбудеться “ 20 ” квітня 1999 року о 10-00 годині

на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 150

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розісланий 13 березня 1999 року

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук

Лукаш Л.Л.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Біосинтез білка реалізує генетичну інформацію, закладену в ДНК, для забезпечення життєдіяльності клітини. Насьогодні стало очевидним значне ускладнення процесу білкового синтезу у вищих еукаріот в порівнянні з прокаріотами. Для підтримання ефективності трансляції в значно збільшених за об'ємом клітинах вищих еукаріот є необхідним якісно новий рівень організації, функціонування та регуляції активності трансляційного апарату. Наочним свідомством на користь його існування може бути нерівномірний розподіл, або компартменталізація, компонентів білок-синтезуючого апарату в еукаріотичній клітині (Ryazanov et al, 1987). На час початку наших досліджень було отримано ряд непрямих доказів компартменталізації апарату трансляції, зокрема, виявлено спорідненість аміноацил-тРНК синтетаз до рибосом (Irvin et al, 1972, Ovchinnikov et al, 1978), утворення високомолекулярних

комплексів аміноацил-тРНК синтетаз (Deutscher, 1984), співлокалізація різних компонентів апарату трансляції в еукаріотичних клітинах (Howe et al, 1984, Shestakova et al, 1993). Всі ці дані, хоча й свідчили на користь структурної, статичної компартменталізації білкового синтезу у вищих еукаріот, але не давали ніякої інформації про можливу функціональну роль цього явища.

Одним із основних проявів функціонального значення компартменталізації може бути ченелінг, або пряма передача проміжних продуктів даного метаболічного шляху від одного компонента системи до іншого без дисоціації в розчин (Stere, 1987). Відомо, що такий механізм має місце для деяких метаболічних процесів, проте експериментальних даних щодо його ролі в біосинтезі білка на час початку наших досліджень отримано не було (Спирин, 1989). Крім того, важливим свідомством потенційного регуляторного значення компартменталізації може бути зміна внутрішньоклітинної локалізації компонентів трансляційного апарату в залежності від зовнішніх умов.

Отже, оскільки без з'ясування функціональної ролі компартменталізації неможливе побудування загальної моделі організації, функціонування та регуляції біосинтезу білка у вищих еукаріот, то детальна експериментальна і теоретична розробка концепції функціональної компартменталізації апарату трансляції є однією з найбільш актуальних фундаментальних проблем сучасної молекулярної біології білкового синтезу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (бюджетні теми № 2.2.4.9 “Вивчення стадії елонгації біосинтезу білка у еукаріот” та “Молекулярні основи компартменталізації білкового синтезу вищих еукаріот”). Робота виконувалась також при сприянні отриманих на конкурсних засадах вітчизняних та міжнародних проектів: № 5.2/130 “Компартменталізація як один з механізмів регуляції білкового синтезу” ДКНТ України, № 5.4/61 “Неканонічні взаємодії компонентів білок-синтезуючого апарату вищих еукаріот” і № 5.4/73 “Локалізація факторів елонгації трансляції у фібробластах людини. Вплив стану функціональної активності трансляційного апарату та фаз клітинного циклу” УФД Міністерства науки та технологій України, гранта INTAS № 96-1594 “The organization and regulation of EF-1 α -mediated tRNA/aminoacyl-tRNA channeling in eukaryotic protein synthesis”, короточасних грантів FEBS та EMBO.

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження було розробити та експериментально обґрунтувати концепцію функціональної компартменталізації апарату білкового синтезу, визначити важливість феномену компартменталізації для організації, функціонування та регуляції процесу трансляції в клітинах вищих еукаріот.

Виходячи з мети роботи, було сформульовано такі основні задачі:

- розробити методи перфорації цитоплазматичної мембрани клітин вищих еукаріот, які дозволяють зберегти високу активність пермеабілізованих клітин в трансляції;
- дослідити компартменталізацію та ченелінг аміноацил-тРНК безпосередньо в клітинах ссавців;
- визначити вплив фосфокреатину на локалізацію різних субодиниць фактора елонгації 1 (EF-1H) у фібробластах людини;

- розробити методи отримання високоочищених препаратів фактора елонгації 1α (EF- 1α), фенілаланіл-тРНК синтетази та комплексу валіл-тРНК синтетази з EF-1H і вивчити взаємодію EF- 1α з різними аміноацил-тРНК синтетазами;
- дослідити неканонічний комплекс EF- 1α *GDP*тРНК, зокрема визначити ділянки тРНК, які приймають участь у взаємодії із фактором, та можливість конформаційних змін компонентів комплексу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше безпосередньо в клітинах ссавців показано компартменталізацію та ченелінг аміноацил-тРНК під час трансляції мРНК.

Експериментально доведено існування передбачуваної гіпотезою ченелінга тРНК/аміноацил-тРНК функціональної взаємодії аміноацил-тРНК синтетази із EF- 1α та показано різні шляхи її здійснення.

Вперше продемонстровано утворення неканонічного комплексу EF- 1α *GDP*тРНК і запропонована функція такого комплексу, що полягає в транспортуванні тРНК від рибосоми до аміноацил-тРНК синтетази, а також показано формування четвертинного комплексу EF- 1α *GDP*тРНК*аміноацил-тРНК синтетаза.

Показана можливість зміни внутрішньоклітинної локалізації компонентів апарату трансляції в залежності від зовнішніх умов, що свідчить про ймовірність існування нового рівня регуляції білкового синтезу за рахунок його компартменталізації - декомпартменталізації. Виявлено інгібіторний вплив неактивних конформерів тРНК, які утворюються в організмі за несприятливих умов, на трансляцію мРНК, що є новим свідомством на користь їх участі в регуляції білкового синтезу в клітинах ссавців.

Вперше розроблено схему ченелінга тРНК/аміноацил-тРНК, яка детально описує різні варіанти передачі тРНК між компонентами апарату трансляції під час білкового синтезу. Зокрема, висунуто припущення про протилежно направлену дію комплексів EF- 1α *GDP и EF- 1α *GTP в перенесенні тРНК від рибосоми до аміноацил-тРНК синтетази та аміноацил-тРНК від синтетази до рибосоми відповідно.

Грунтуючись на отриманих даних, вперше представлено концепцію функціональної компартменталізації апарату білкового синтезу у вищих еукаріот та висунуто гіпотетичну модель структурно-функціональної організації трансляційного компартменту.

Теоретична та практична цінність одержаних результатів. Основним результатом виконання даної роботи стала розробка концепції функціональної компартменталізації трансляції у вищих еукаріот, що є істотним вкладом у розвиток теорії еукаріотичного білкового синтезу і має загальнобіологічне значення у розумінні фундаментальних основ життєдіяльності клітини. Результати досліджень широко цитуються міжнародною науковою спільнотою та створюють підґрунтя для подальших досліджень біосинтезу білка та ченелінга метаболітів. Отримані результати рекомендуються для використання в загальному курсі “Молекулярна біологія” та спецкурсі “Біосинтез білка” для студентів університетів зі спеціальності “біохімія” та “молекулярна біологія”. Отримані за розробленим нами методом препарати фактора елонгації 1α використовуються для вивчення різних аспектів білкового синтезу в групі фізики нуклеопротейнів Інституту Білка, Пушціно, Росія, у відділі медичної біохімії Університету м.Лейден, Нідерланди, в

Лабораторії молекулярної ензимології CNRS, Жіф-сюр-Івет, Франція, та в Центрі Здоров'я Університету Конектікута, Фармінгтон, США.

Особистий внесок здобувача. Нові теоретичні та експериментальні ідеї, що розроблялися в дисертації, належать автору. Експерименти, що описані в розділах 3, 4 та 6, здійснено особисто автором. Один експеримент в роботі із пермеабілізованими клітинами виконано в тісному співробітництві з Р.Стапульонісом. У виконанні експериментів, що представлені в розділі 5, крім автора, приймали участь співробітники відділу механізмів трансляції генетичної інформації ІМБіГ НАНУ Т.В.Будкевич, З.М.Петрушенко і В.Ф.Шалак. Дослідження ендогенної флуоресценції EF-1 α виконано в тісному співробітництві з О.С. Ладохіним. Отримані в співробітництві результати опубліковано як спільні наукові статті.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були оприлюднені на Школі-конференції “Структура и функция биополимеров”, Львів, 1988; VI Симпозіумі “Macromolecules in functioning cell” USSR-Italy, Ленінград, 1988; Міжнародному симпозіумі “Regulation of translation”, Рига, 1989; 14 Робочій нараді з тРНК, Познань, Польща, 1991; Дослідницькій Гордоновській конференції “Макромолекулярна організація та функція клітин”, Окснард, США, 1995; 16 Робочій нараді з тРНК, Медісон, США, 1995; Міжнародній конференції “Frontiers in Translation”, Вікторія, Канада, 1995; 17 Робочій нараді з тРНК, Шіба, Японія, 1997; 17 Міжнародному Конгресі з Біохімії та Молекулярної Біології, Сан-Франціско, США, 1997; Міжнародній конференції “Молекулярная генетика и биотехнология”, Мінськ, Беларусь, 1998; Робочій нараді зі структури та функції аміноацил-тРНК синтетаз, Мітельвір, Франція, 1998.

Наукові результати доповідалися також на семінарах відділу механізмів трансляції генетичної інформації ІМБіГ НАН України, відділу біохімії Університету штату Конектікут, США, лабораторії медичної генетики Лейденського Університету, Нідерланди, Інституту молекулярної біології Університету Вітген-Хердеке, Німеччина, Лабораторії молекулярної ензимології CNRS, Франція, групи фізики нуклеопротеїнів Інституту Білка, Росія.

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи в повному об'ємі надруковані в 27 публікаціях, з них 18 статей у вітчизняних та міжнародних фахових наукових виданнях.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, загальних підсумків, висновків та списку літератури, який включає 371 посилання. Робота викладена на 336 сторінках машинописного тексту і містить 74 рисунки та 4 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи. Клітини яєчника китайського хом'ячка (СНО) надано Д.Пактером (США). Первинну культуру фібробластів людини VH 25 (15-18 пасажі) була отримана від Я.Дейка (Нідерланди). тРНК з печінки кроля отримували прямою депротеїнізацією гомогената тканини фенолом та хроматографією на DEAE-целюлозі, як описано нами раніше (Негруцкий и др., 1985). 40S і 60S рибосомні субчастинки отримували, як описано нами раніше (Негруцкий, 1981). Аміноацил-тРНК в препаративній кількості була синтезована як описано (Yang et al, 1971). тРНК^{Phe} і тРНК^{Leu} були очищені з сумарної тРНК печінки кроля хроматографією в системі HPLC Gold на колонці Hypersil 5C4 (Beckman). ³²P-мічення тРНК проводили згідно (Silberclang et al,

1977). Очищення EF-1 α здійснювали за розробленим нами методом, який складається з таких етапів: гельфільтрація на сефакрилі S-400, хроматографія на DEAE-целюлозі та SP-сефарозі. Чистота препарату EF-1 α становила більш ніж 90%. Препарат білка мав високу активність в обміні GDP/³H-GDP, каталізі зв'язування фенілаланіл-тРНК з полі(U)-запрограмованими рибосомами та синтезі полі(Phe) на полі(U)-запрограмованих рибосомах. Очищення фенілаланіл-тРНК синтетази здійснювали згідно із запропонованою нами методикою фракціонуванням постмітохондріального супернатанту ПЕГ6000, хроматографією на гідроксіапатиті та фосфоцеллюлозі, гельфільтрацією на Sephacryl S-300. Чистота препарату фенілаланіл-тРНК синтетази становила більш ніж 80%, згідно електрофорезу в денатуруючих умовах. Очищення комплексу валіл-тРНК синтетази і EF-1H з печінки кролів проводили за такою схемою: фракціонування ПЕГ6000, гельфільтрація на BioGel A5m, хроматографія на тРНК-сефарозі та на аніонообміннику SourceQ. Дисоціацію компонентів комплексу під дією NaSCN та обмежений протеоліз цих компонентів проводили, як описано (Вес, 1989). Вплив EF-1 α на каталітичну активність аміноацил-тРНК синтетаз вивчали в 100 мкл стандартної суміші для аміноацилювання тРНК (Вес et al, 1989) з додаванням 10% гліцерину та 100 мкМ GTP або GDP. До суміші вносили 5 - 50 пмоль EF-1 α або контрольних білків. Вплив EF-1 α на АТР/PPi обмін, який каталізує фенілаланіл-тРНК синтетаза, вивчали в 100 мкл суміші, що містила 100 мМ HEPES рН 7.5, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ фенілаланін, 2.5 мМ АТР, 1мМ ³²P-PPi (100 Кі/моль), 1 мг/мл БСА, 0.5 мМ дітіотреїтол, 10 % гліцерин.

Пермеабілізацію суспензії клітин СНО здійснювали 75 мкг/мл сапоніном, клітин VH 25 *in situ* – 125 мкг/мл сапоніном в оптимізованих для різних клітин умовах. Біосинтез білка в пермеабілізованих клітинах VH25 вивчали під час їх інкубації в суміші, що містила 130 мМ цукрозу, 50 мМ ацетат калію, 50 мМ KCl, 20 мМ HEPES, рН 7.4, 0.5 мМ DTT, 5 мМ АТР, 13 мМ фосфокреатин, 5 мМ глюкозу, 6 мМ ацетат магнію, 0.4 мМ GTP, 30 мкг/мл креатинкіназу, 240 мкМ радіоактивну амінокислоту та решту немічених амінокислот, 240 мкМ кожної, при 37⁰С. Для клітин СНО кінцеві концентрації деяких реагентів були іншими, зокрема: 0.8 мМ АТР, 0.07 мМ GTP, 7.5 мМ фосфокреатин, 1.3 мМ ацетат магнію, суміш п'яти чи п'ятнадцяти ¹⁴C-амінокислот та решту немічених амінокислот, 250 мкМ кожна. Радіоактивність, що залишалась в ТХО-осаді після кип'ятіння, свідчила про кількість синтезованих поліпептидів, а різниця між радіоактивністю осадів, що були отримані обробкою гарячою та холодною ТХО, вказувала на кількість аміноацил-тРНК в інкубаційній суміші. Трансляцію полі(U) та глобінової мРНК в білоксинтезуючій системі із зародків пшениці та ендегенний білковий синтез в лізаті ретикулоцитів кроля проводили як описано (Клеменс, 1987).

РНКаза А з підшлункової залози бика та тРНК були модифіковані відповідно ФІТЦ та флуоресцеїнсемікарбазидом згідно раніше описаних методик (Melan et al, 1992). З метою флуоресцентної модифікації EF-1 α та EF-1 δ діалізували проти 100 мМ карбонатного буфера, рН 8. 3, 50 мМ NaCl, 20% гліцерину та інкубували в присутності ФІТЦ (0.1 мг/мл). Мічення зупиняли NH₄Cl (кінцева концентрація 50 мМ), і білки відокремлювали від ФІТЦ хроматографією на сефадексі G-25. Внутрішньоклітинну флюоресценцію вивчали на живих або фіксованих 3.7% формальдегідом клітинах, використовуючи конфокальний мікроскоп Bio-Rad MRC-600 або світловий мікроскоп, обладнаний для реєстрації флуоресценції.

Флуоресценцію триптофанілових залишків в молекулі EF-1 α вимірювали на спектрофлуориметрі SLM-8100 (SLM/Aminco) при довжині хвилі збудження 297 нм із шириною щілини 2 нм для збуджуючого променя і 8 нм для променя, що випускається. Узагальнені спектри емісії були отримані для 10-30 вимірювань від 310 до 500 нм з інтервалом в 1 нм. Обмежений РНКазний гідроліз та модифікацію тРНК етилнітрососечовиною проводили, як описано раніше (Boutorin et al., 1981, Jekowsky et al., 1977, Петрушенко и др, 1990). Утворення четвертинного комплексу EF-1 α -GDP-тРНК^{Phe}-фенілаланіл-тРНК синтетаза перевіряли в 0.7% агарозному гелі, спостерігаючи за затримкою ³²P-тРНК^{Phe} в гелі внаслідок взаємодії з білком.

Компартменталізація та ченелінг аміноацил-тРНК в клітинах ссавців. На першому етапі досліджень функціональної компартменталізації ми вважали за необхідне довести принципову можливість ченелінга аміноацил-тРНК безпосередньо в клітинах ссавців. Для досягнення цієї мети потрібно було розробити спосіб доставки аміноацил-тРНК до цитоплазми, оскільки за нормальних умов тРНК не здатна проходити крізь клітинну мембрану. При цьому було абсолютно необхідно дотримуватися двох умов: забезпечити вільний доступ екзогенних макромолекул до клітини та максимально зберегти при цьому інтактність організації її білок-синтезуючого апарату.

Для перфорації цитоплазматичної мембрани клітин СНО було обрано два методи – електропорацію та обробку детергентами, зокрема сапоніном. Пермеабілізація сапоніном виявилася більш м'якою процедурою, яка не ушкоджувала внутрішньоклітинну організацію апарату білкового синтезу. В таблиці 1 наведено дані типового експерименту по визначенню розподілу РНК та білка в клітинах СНО, що інкубувалися в присутності ³H-уридину або суміші ³H-амінокислот, між пермеабілізованими клітинами та міжклітинним простором. З таблиці 1 видно, що обробка сапоніном призводить до незначного зменшення

Таблиця 1.

Вихід пресинтезованих ³H-РНК та ³H-білка з пермеабілізованих клітин СНО.

Фракція	Кількість клітин, %	РНК, %	Кількість клітин, %	Білок, %
Інтактні клітини	100	100	100	100
Супернатант після пермеабілізації	-	13	-	19
Клітини після пермеабілізації	78	-	90	-
Супернатант після промивання клітин	-	6	-	8
Клітини після промивання	81	81	84	66

кількості інтактних клітин, причому кількість РНК та білків, що вивільнились із пермеабілізованих клітин, приблизно дорівнює кількості зруйнованих клітин. Таким чином, деяка популяція клітин (близько 20%) є чутливою до сапоніну та руйнується під час пермеабілізації, вивільняючи свою РНК та білок назовні, в супернатант, але решта клітин, незважаючи на перфорованість їх мембран, зберігають РНК та білок. Слід підкреслити, що внутрішній об'єм таких клітин є цілком доступним екзогенним макромолекулам, які швидко та рівномірно розподілялися в цитоплазмі пермеабілізованих клітин. Останнє було доведено конфокальною мікроскопією клітин, до яких було додано флуоресцентно модифіковані тРНК або РНКазу А. Таким чином, отримані дані свідчать про принципову можливість компартименталізації РНК та білків в клітинах ссавців. Але наскільки активними в трансляції мРНК є пермеабілізовані за запропонованою методикою клітини? Для відповіді необхідно порівняти швидкість білкового синтезу в пермеабілізованих та інтактних клітинах. Після оптимізації концентрацій низькомолекулярних компонентів білок-синтезуючого апарату в пермеабілізованих клітинах було досягнуто практично ідентичну з інтактними клітинами швидкість трансляції на протязі щонайменш 30 хвилин (рис. 1). Таким чином, вперше було створено систему сполученої пермеабілізації-трансляції в клітинах ссавців, яку можна використовувати для вивчення структурно-функціональної організації апарату білкового синтезу *in vivo*. Досягнення високої ефективності білкового синтезу свідчить про максимальне збереження інтактності апарату трансляції в пермеабілізованих клітинах. Це також підтверджує низький рівень виходу з них макромолекул білкової та рибонуклеїнової природи (див. табл. 1). Але відкритим залишалося питання, чи здатні низькомолекулярні кофактори трансляції вільно дисоціювати із перфорованих клітин? Для перевірки можливості компартименталізації низькомолекулярних сполук, які беруть участь у трансляції, було вивчено їх вплив на ефективність біосинтезу білка в пермеабілізованих клітинах СНО. Дані типового експерименту наведено в табл. 2. Видно, що вилучення АТР або АТР разом з GTP

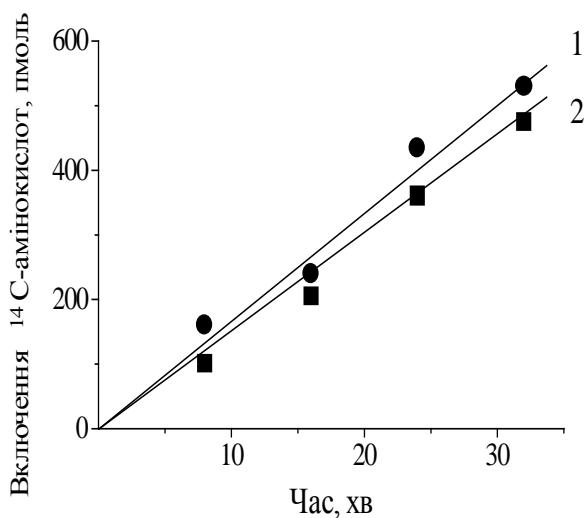


Рис. 1. Включення ^{14}C -амінокислот до ТХО-нерозчинного осаду в пермеабілізованих сапоніном (1) або інтактних (2) клітинах СНО. Наведено включення мітки в $9.4 \cdot 10^7$ інтактних або пермеабілізованих клітин.

Важливість низькомолекулярних сполук та креатинкінази для білкового синтезу в пермеабілізованих клітинах СНО.

Вилучені з суміші для білкового синтезу компоненти	Включення ¹⁴ C-фенілаланіну до синтезованих поліпептидів, %
повна суміш	100
АТР	54
GTP	90
АТР и GTP	49
Фосфокреатин	4
Креатинкіназа	89
Суміш амінокислот	56
Mg ²⁺	5
K ⁺ (додано Na ⁺)	13
Дитіотреїтол	85

із суміші для білкового синтезу, в якій проводили інкубацію клітин, зменшувало швидкість білкового синтезу лише наполовину. Відсутність екзогенного GTP зовсім не впливала на трансляцію. Не спостерігалось значного ефекту і при відсутності екзогенної креатинкінази. Кардинальний позитивний вплив на білковий синтез мала лише присутність екзогенного фосфокреатину. Можна зробити висновок, що вся АТР, що залишається в клітинах після пермеабілізації, швидко утилізується, але може бути ефективно регенерована в присутності екзогенного фосфокреатину. Відсутність істотної залежності від екзогенних фосфокреатинкінази та GTP може свідчити про входження до трансляційного компартменту ферментів, які не мають прямого відношення до трансляції – креатинкінази та нуклеозиддифосфокінази. Цікаво, що за відсутності екзогенних амінокислот та в умовах значного розбавлення клітинного вмісту в пермеабілізованих клітинах швидкість білкового синтезу падала тільки удвічі. Це свідчить на користь компарменталізації амінокислот у клітинах ссавців [Smith et al., 1988, Samarel et al., 1991]. Також цікавим є отриманий результат, що додавання надлишку тРНК (до 1 мг/мл) до пермеабілізованих клітин ніяк не впливає на білковий синтез. Ці дані та відсутність дисоціації РНК з пермеабілізованих клітин (див табл.1) були першими, що свідчать про можливу компарменталізацію тРНК в клітинах ссавців. Виявлена нами відсутність істотної різниці в спектрах білків, що були синтезовані в пермеабілізованих та інтактних клітинах, свідчить, що мРНК теж можуть залишатися імобілізованими в перфорованих клітинах. Таким чином, система білкового синтезу в пермеабілізованих клітинах як кількісно, так і якісно відповідає білковому синтезу в інтактних клітинах. Тому така система може бути використана для вирішення одного з основних завдань роботи - доказу компарменталізації та ченелінга аміноацил-тРНК *in vivo*.

Якщо аміноацил-тРНК дійсно компарменталізована в клітинах СНО, вона не повинна виходити із клітин і після їх пермеабілізації. Тому вивчаючи розподіл аміноацил-тРНК між внутрішньоклітинним та позаклітинним об'ємами, можна підтвердити чи спростувати існування такої компарменталізації. Отже, суміш ¹⁵ ¹⁴C-амінокислот та відповідних ³H-аміноацил-тРНК

була додана до пермеабілізованих клітин. Центрифугуванням аліквот клітин через певні часові інтервали було визначено відносну кількість екзогенної (^3H) аміноацил-тРНК, яка слугувала за внутрішній контроль, та ендогенно синтезованої (^{14}C) аміноацил-тРНК у клітинній фракції та в супернатанті (рис.2). Виявилось, що розподіл ендогенної та екзогенної аміноацил-тРНК між цими двома фракціями дуже відрізняється. Для екзогенної аміноацил-тРНК співвідношення її кількості усередині та поза клітинами було еквівалентне співвідношенню клітинного та позаклітинного об'ємів (приблизно 0.2), що свідчило про безперешкодний обмін екзогенної аміноацил-тРНК між позаклітинним та внутрішньоклітинним просторами. Навпаки, у випадку ендогенної аміноацил-тРНК спостерігалася її затримка (в наведеному експерименті більш ніж в 25 разів в порівнянні з екзогенною аміноацил-тРНК) та наступна дуже повільна дисоціація із пермеабілізованих клітин.

Ще одним критерієм компартменталізації ендогенної аміноацил-тРНК може бути її стійкість до дії доданої до пермеабілізованих клітин РНКаз. Схема експерименту була такою ж - ^3H -аміноацил-тРНК додавали екзогенно, а ^{14}C -аміноацил-тРНК синтезувалася безпосередньо в клітинах. Вплив РНКаз А на екзогенну та ендогенну аміноацил-тРНК наведено на рис.3. Видно, що ^3H -радіоактивність швидко зникає при РНКазній обробці,

Рис.2 Співвідношення внутрішньоклітинної та позаклітинної аміноацил-тРНК після інкубації пермеабілізованих клітин СНО із сумішшю ^{14}C -амінокислот (1) та відповідних ^3H -аміноацил-тРНК (2). 3 – співвідношення клітинного та зовнішнього об'ємів в даному експерименті.

Рис.3. Вплив РНКаз А на ендогенну (1) та екзогенну (2) аміноацил-тРНК в пермеабілізованих клітинах СНО, а також на ендогенну аміноацил-тРНК (3) в гомогенаті клітин. 100% для кожного випадка - кількість аміноацил-тРНК за відсутності РНКаз.

вказуючи на повну доступність для РНКаз екзогенної аміноацил-тРНК. В той же час ендогенна ^{14}C -аміноацил-тРНК захищена від дії РНКаз. Слід підкреслити, що низька ефективність РНКазного гідролізу ^{14}C -аміноацил-тРНК не є наслідком утрудненого доступу РНКаз А до пермеабілізованих клітин, бо, як згадувалося вище, флуоресцентно модифікована РНКаз А має необмежений доступ до таких клітин і розподіляється усередині клітини досить рівномірно. Більш того, якщо пермеабілізовані клітини, що містять ендогенну та екзогенну аміноацил-тРНК, гомогенізувати перед обробкою нуклеазою, то не спостерігається ніякої різниці у рівні гідролізу обох видів аміноацил-тРНК (рис.3, крива 3).

Таким чином, в описаних вище експериментах ми одержали перші суттєві докази компартменталізації аміноацил-тРНК в клітинах ссавців. Але залишалось невідомим, чи існує

зв'язок між компартменталізацією апарату трансляції та ефективністю білкового синтезу. Інакше кажучи, потрібно було визначити можливе функціональне значення компартменталізації аміноацил-тРНК. Серед потенційних механізмів, що реалізують перевагу компартменталізації, чільне місце займає ченелінг, або безпосередній, без виходу в розчин, транспорт проміжних продуктів між послідовними учасниками конкретного метаболічного шляху (Stere, 1987, Спирин, 1989). Головним критерієм існування ченелінга метаболітів є неможливість залучення до метаболічного ланцюга пресинтезованих екзогенно проміжних продуктів цих реакцій, тому що, згідно визначенню, каналізований процес є закритим до останніх (Srivastava et al, 1987). Оскільки проміжна сполука біосинтезу білка – аміноацил-тРНК, то, порівнявши рівень використання для білкового синтезу ендогенної та екзогенної аміноацил-тРНК, можна зробити висновок відносно ченелінга цього метаболіту в клітинах ссавців. Переважне використання ендогенної, синтезованої безпосередньо в клітинах аміноацил-тРНК було б прямим позитивним свідченням щодо існування механізму ченелінга в білковому синтезі.

Для перевірки цього положення знов були використані експерименти із подвійним міченням, в яких ендогенно синтезована аміноацил-тРНК була ^{14}C -міченою, а пресинтезована екзогенна аміноацил-тРНК - ^3H -міченою. В клітинному екстракті не було виявлено переваги жодної аміноацил-тРНК у використанні для білкового синтезу. Це свідчило про відсутність ченелінга ендогенної аміноацил-тРНК в безклітинній білок-синтезуючій системі. Але неможливість продемонструвати ченелінг *in vitro* ще не свідчить про відсутність цього механізму безпосередньо в клітинах. Цілком можливо, що для функціонування механізму ченелінга необхідна інтактна організація білок-синтезуючого апарату, яку може бути зруйновано під час гомогенізації клітин. Як показано вище, розроблена нами система пермеабілізації-трансляції залишає апарат білкового синтезу майже недоторканим. Беручи це до уваги, аналогічні експерименти було проведено в пермеабілізованих клітинах. ^3H -аміноацил-тРНК та ^{14}C -амінокислоти було добавлено безпосередньо до пермеабілізованих клітин, і включення кожної мітки до поліпептидного ланцюга порівнювали із рівнем відповідної аміноацил-тРНК в клітинах на той же час. Співвідношення цих параметрів було показником ефективності використання екзогенної та ендогенної аміноацил-тРНК. Як видно з рис.4, показники ефективності використання аміноацил-тРНК дуже відрізняються для ендогенного та екзогенного попереднього продуктів. ^{14}C -ізопоп утилізується в 15 разів більш ефективно ніж ^3H -ізопоп, тобто ендогенна аміноацил-тРНК є набагато більш ефективним проміжним продуктом для біосинтезу білка, ніж екзогенна. Аналогічні результати було отримано в системі електропорованих клітин СНО. Необхідно зауважити, що переважне використання ендогенної аміноацил-тРНК спостерігалося незважаючи на те, що, згідно з даними конфокальної мікроскопії, екзогенна

Рис. 4. Білковий синтез в пермеабілізованих сапоніном клітинах СНО з використанням ендогенних (А) та екзогенних (Б) аміноацил-тРНК. 1 – включення мітки до аміноацил-тРНК, 2 – включення мітки до поліпептидних ланцюгів. Кількість клітин в даному експерименті – $3.8 \cdot 10^6$.

тРНК швидко потрапляє до пермеабілізованих клітин і розподіляється в них досить рівномірно.

Отже, показано, що обидва критерія ченелінга - утрудненість використання екзогенного проміжного продукту, так само як і структурна відокремленість ендogenousного попередника, виконуються під час біосинтезу білка в клітинах ссавців. Таким чином, отримано перші експериментальні дані, які свідчать про існування функціональної компартменталізації аміноацил-тРНК. Ченелінг ендogenousної аміноацил-тРНК призводить до ефективного, на відміну від екзогенної аміноацил-тРНК, її використання. На базі даних, що викладено в даному розділі, та беручи до уваги відому до початку наших досліджень схему циклу елонгації стало можливим уявити гіпотетичний цикл ченелінга аміноацил-тРНК та тРНК під час трансляції (рис.5). У такому циклі аміноацил-тРНК передається від аміноацил-тРНК синтетази до фактора елонгації EF-1 α і далі на рибосому без виходу до розчину. Оскільки експерименти на клітинному рівні не дозволяли судити про можливого посередника в передачі тРНК від рибосоми до аміноацил-тРНК синтетази, умовно було позначено, що тРНК передається з рибосоми прямо до аміноацил-тРНК синтетази. Запропоновано, що ченелінг аміноацил-тРНК від білка до білка відбувається в спеціальних трансляційних компартментах, організація яких руйнується при гомогенізації.

Локалізація фактора елонгації 1 в фібробластах людини. Ефект функціональної активності апарату трансляції. Наступним завданням було отримати більш докладну інформацію про існування трансляційних компартментів та можливість змін в їх організації за різних умов функціонування клітини. Було зроблено

Рис.5 Гіпотетична схема ченелінга аміноацил-тРНК під час елонгації еукаріотичного білкового синтезу. АРС – аміноацил-тРНК синтетаза, А, Р, та Е – сайти зв'язування тРНК на рибосомі, чорні круги позначають аміноацил-тРНК, сірі круги – пептидил- або деацильовану тРНК

припущення, що продемонструвати потенційну лабільність трансляційних компартментів можливо за різних енергетичних станів

клітини, що супроводжуються змінами трансляційної активності. Як маркери було використано білки, що є найбільш ймовірними компонентами таких компартментів - α і δ субодиниці фактора елонгації EF-1. Завданням даного етапу досліджень було з'ясувати, чи змінюється, і яким чином, внутрішньоклітинна локалізація EF-1 α и EF-1 δ в залежності від вмісту фосфокреатину, відсутність якого в інкубаційній суміші, як показано нами вище, спричиняє повну зупинку білкового синтезу в пермеабілізованих клітинах (див. табл.2).

Оскільки експерименти з вивчення локалізації білків краще проводити на іmobілізованих на поверхні клітинах, як модель була вибрана первинна культура фібробластів людини Vh25, які росли прикріпленими до поверхні чашок Петрі. Після адаптації методу пермеабілізації,

розробленого нами раніше для суспензії клітин СНО, до фібробластів людини, було показано, що швидкість трансляції в пермеабілізованих фібробластах була лінійною на протязі 15-20 хвилин. Цього часу було цілком достатньо для проведення експериментів з вивчення локалізації білків в присутності або за відсутності фосфокреатину.

В цій роботі застосовано методичний підхід для вивчення внутрішньоклітинної локалізації компонентів апарату трансляції, який дещо відрізняється від стандартних імунофлуоресцентних досліджень. Використання розробленої нами системи пермеабілізованих клітин дає змогу легко маніпулювати білковими компонентами апарату трансляції, тобто додавати модифіковані флуоресцеїнізотіоціанатом EF-1 α та EF-1 δ безпосередньо до клітин, які знаходяться в тому чи іншому функціональному стані, та вивчати внутрішньоклітинну локалізацію цих білків безпосередньо під час активної трансляції, або коли її зупинено. Виявлено, що в нормі розподіл EF-1 α в фібробластах людини є більш гранулярним, ніж розподіл цього білку в клітинах, інкубованих без фосфокреатину (рис.6 а,б). Цікавим виявився факт наявності EF-1 α в клітинному ядрі, особливо за відсутності фосфокреатину, коли переважна більшість молекул цього білку має ядерну локалізацію. На відміну від EF-1 α , локалізація EF-1 δ не залежить від присутності фосфокреатину в інкубаційній суміші (рис.6 в,г). В обох випадках спостерігається чітко виражена гранулярна картина розподілу цієї субодиниці фактора елонгації в цитоплазмі. Таким чином, дискретна цитоплазматична локалізація в присутності фосфокреатину була притаманна обом білкам, в той час коли виключення фосфокреатину із інкубаційної суміші призводило до перерозподілу EF-1 α , але не змінювало локалізацію EF-1 δ .

Слід визначити, що для зменшення неспецифічних ефектів усі експерименти з флуоресцентно модифікованими субодиницями EF-1 проводилися в присутності високої концентрації (6 мг/мл) овальбуміну. Для перевірки функціонального значення зміни локалізації EF-1 α було вивчено розподіл в клітині флуоресцентно модифікованого інактивованого EF-1 α . Виявлено, що інактивація EF-1 α призводила до зменшення кількості цього білка в цитоплазмі і до нагромадження його у ядрі (рис.6д), причому ця картина спостерігалася за умов інкубації клітин у повній, включаючи фосфокреатин, суміші для білкового синтезу. Отже, внутрішньоклітинна локалізація неактивного EF-1 α при активному білковому синтезі була подібною до локалізації активного EF-1 α за умов, коли білок-синтезуючий апарат практично не функціонує. На базі цих даних можна зробити припущення, що коли EF-1 α не приймає участі в трансляції, більша частина його молекул знаходиться у клітинному ядрі. За умов повного збереження функціональної активності системи трансляції, локалізація EF-1 α та EF-1 δ подібна та має дещо гранулярний характер. Треба відзначити, що гранулярний розподіл EF-1 δ у фібробластах людини був нещодавно підтверджений імунофлуоресцентним методом (Sanders et al., 1996). Картина дискретної локалізації субодиниць фактора елонгації EF-1 є подібною до розподілу в олігодендроцитах зерен, які містили мРНК, рРНК, EF-1 α та аргініл-тРНК синтетазу (Barbarese et al., 1995). Такі зерна-гранули можуть являти собою трансляційні компартменти, які функціонують в цитоплазмі нервових клітин. Нами встановлено, що надходження такого важливого компоненту апарату трансляції як EF-1 α до запропонованих трансляційних компартментів може залежати від ефективності процесу білкового синтезу в клітині (рис.6). Ці дані є

Рис.6 Локалізація флуоресцентно модифікованих EF-1 α (А,Б), EF-1 δ (В,Г) та інактивованого EF-1 α (Д) в пермеабілізованих фібробластах людини, що були інкубовані в суміші для білкового синтезу в присутності (А,В,Д) або без (Б,Г) фосфокреатину.

першими, що свідчать про можливість енергетично-залежної зміни локалізації компонентів апарату трансляції в еукаріотичній клітині.

Беручи за основу модель функціонування комплексу EF-1H (Janssen et al, 1994) можна інтерпретувати одержані нами дані таким чином: EF-1 δ є частиною стаціонарного комплексу EF-1 $\beta\gamma\delta$, асоційованого із клітинними структурами, EF-1 α перебуває в цьому комплексі лише під час GDP/GTP обміну на його молекулі. Внутрішньоклітинна концентрація EF-1 α принаймні на порядок перевищує концентрацію EF-1 $\beta\gamma\delta$. Тому при активному білковому синтезі спостерігається подібна локалізація EF-1 α та EF-1 δ , а при зупинці трансляції відбувається зміна локалізації EF-1 α , але не EF-1 δ , який залишається імобілізованим на клітинних структурах.

Цікавим є факт локалізації EF-1 α в клітинному ядрі. Ці дані були незалежно підтверджені методами імунофлуоресценції та імуноелектронної мікроскопії (Sanders et al, 1996, Barbarese et al., 1995). Ядерна локалізація EF-1 α може бути проявом виконання цією молекулою деяких неканонічних функцій, зокрема запропонованою нами участі EF-1 α в транспорті щойно синтезованих тРНК з ядра до трансляційних компартментів у цитоплазмі.

Отже, вперше встановлено можливість зміни локалізації компонентів апарату трансляції у відповідь на негативні впливи, зокрема на енергетичну недостатність. Цілком можливо, що перерозподіл молекул EF-1 α в залежності від фосфокреатину відзеркалює загальні зміни в структурі лабільних, не зв'язаних тривало із клітинними структурами компонентів трансляційних компартментів. Відсутність змін локалізації EF-1 δ свідчить про те, що комплекс EF-1 $\beta\gamma\delta$ може бути одним з базових компонентів таких компартментів, які забезпечують “прив'язування” компартментів до конкретного місця синтезу того чи іншого білка. Крім того, ці результати свідчать на користь існування нового рівня регуляції білкового синтезу, який може здійснюватися шляхом асоціації/дисоціації трансляційних компартментів.

Одним із компонентів такої регуляторної системи можуть бути біологічно неактивні конформери тРНК, які з'являються в організмі за несприятливих умов (Мацука и др., 1972). Раніше ми показали, що такі конформери здатні утворювати стабільний непродуктивний комплекс з аміноацил-тРНК синтетазами та рибосомами (Негруцкий и др., 1984, Негруцкий и др., 1986), і висунули припущення, що це може мати певне регуляторне значення. В дисертації продемонстровано, що присутність неактивних конформерів тРНК впливає на трансляцію природних мРНК *in vitro*, тобто показано принципову можливість регуляторного впливу неактивних конформерів тРНК на трансляцію. Формування стабільних непродуктивних комплексів тРНК з іншими компонентами апарату трансляції може призводити до порушення механізму їх входу до трансляційного компартменту або навіть до розпаду такого компартменту. Чи дійсно такий механізм функціонує у клітинах ссавців, має бути перевірено в подальших дослідженнях.

Взаємодія макромолекул під час ченелінга тРНК в процесі трансляції у еукаріот. Таким чином, в експериментах, проведених з клітинами, отримано ряд даних, що підтверджують можливість існування в них трансляційних компартментів, які забезпечують функціонування механізму ченелінга та обмежують доступ всередину екзогенних аміноацил-тРНК. Крім того, показано, що відсутність таких макроергів як фосфокреатин в клітині може призводити до розпаду компартментів чи, принаймні, до виходу з них окремих компонентів апарату трансляції. Слід відзначити, що недоліком експериментів *in vivo* є те, що вони здатні вирішити проблему лише в загальному плані, тобто підтвердити можливість ченелінга аміноацил-тРНК в клітинах, але не дають інформацію про детальний механізм ченелінга. Тому було необхідним змодельювати ці взаємодії в дослідах *in vitro*, вивчаючи можливість асоціації ізольованих компонентів апарату трансляції, що мають спорідненість до тРНК. Оскільки основне місце в ланцюзі ченелінга займає гіпотетичне перенесення аміноацил-тРНК від аміноацил-тРНК синтетази до EF-1 α , і ніякої інформації про асоціацію цих двох білків до початку наших досліджень не існувало, ми вважали за доцільне з'ясувати принципову можливість такої взаємодії в дослідах *in vitro*, на рівні індивідуальних білків.

З точки зору гіпотези ченелінга найбільш придатним для вивчення цього механізму здається стабільний комплекс EF-1H з валіл-тРНК синтетазою, який містить EF-1 α , білки, що каталізують GDP/GTP обмін в його молекулі, та аміноацил-тРНК синтетазу. Раніше було виявлено, що кінетичні параметри реакції аміноацилювання не залежать від асоціації валіл-тРНК синтетази з EF-1H і практично однакові для вільної та зв'язаної з EF-1H синтетази (Вес et al, 1989). Проте, згідно з гіпотезою ченелінга, що передбачає участь EF-1 α в дисоціації аміноацил-тРНК з аміноацил-тРНК синтетази, така дисоціація повинна проходити при формуванні потрібного комплексу валіл-тРНК*EF-1 α *GTP. Із цього випливає, що для виявлення якогось ефекту кількість молекул EF-1 α в інкубаційній суміші повинна дорівнювати кількості молекул продукту реакції, аміноацил-тРНК, а не кількості молекул ферменту, як спостерігається в комплексі валіл-тРНК синтетаза-EF-1H. Надлишок EF-1 α потрібен, щоб забезпечити можливість постійного відтоку аміноацил-тРНК від валіл-тРНК синтетази. Швидкість синтезу валіл-тРНК в присутності надлишку EF-1 α та GTP наведено на рис.7. Дійсно, у цьому випадку спостерігається двократне прискорення реакції. Цікаво, що форма кінетичної кривої – двофазова. Швидкість синтезу валіл-тРНК зменшується з 2.5 пмоль/хв в першій фазі до 1.8 пмоль/хв у другій. При відсутності надлишку EF-1 α швидкість синтезу валіл-тРНК становила 1.25 пмоль/хв.

При заміні GTP на GDP стимуляції валіл-тРНК синтетазної активності фактором не спостерігалось (рис.8), що підтверджує можливість участі класичного потрібного комплексу EF-1 α *GTP*аміноацил-тРНК в механізмі стимуляції. Дія GMPPNP - аналога GTP, що не гідролізується, була аналогічною, хоч і меншою по амплітуді, ніж дія GTP. Зменшення стимуляції валіл-тРНК синтетази в присутності аналога GTP можна пояснити зниженням здатності $\beta\gamma\delta$ субодиниць EF-1H каталізувати формування EF-1 α -GTP внаслідок утворення відносно стабільного комплексу EF-1 $\beta\gamma\delta$ *GMPPNP, який виводить частину молекул EF-1H

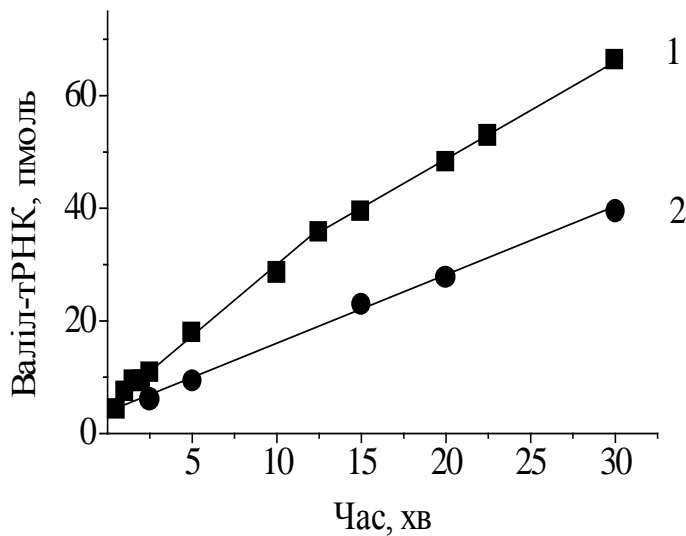


Рис.7 Швидкість синтезу ^{14}C -валіл-тРНК валіл-тРНК синтетазою в комплексі з EF-1H в присутності (1) чи без (2) EF-1 α . Концентрація фермента в пробі - 0.6 нМ. 50 пмоль EF-1 α містилося в 100 мкл інкубаційної суміші.

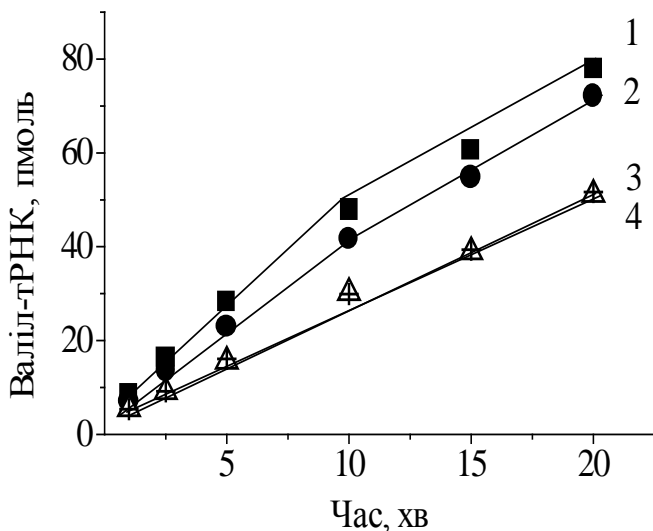


Рис.8 Активність валіл-тРНК синтетази в комплексі з EF-1H в присутності EF-1 α (50 пмоль/100 мкл суміші) та GTP (1), GMPPNP (2) або GDP (3). (4) - активність фермента в присутності GMPPNP без EF-1 α . Концентрація валіл-тРНК синтетази 2.1 нМ. Концентрації нуклеотидів: 100 мкМ GTP, 140 мкМ GMPPNP, 100 мкМ GDP.

з реакції (Janssen et al, 1988). Ці дані були підтверджені в наших експериментах.

Специфічність ефекту EF-1 α була перевірена заміною у вищеписаній системі еукаріотичного фактора EF-1 α на прокаріотичний EF-Tu. Оскільки, як виявилось, EF-1 $\beta\gamma\delta$ не прискорює обмін нуклеотидів в молекулі EF-Tu, спеціальну увагу було приділено переведенню EF-Tu в GTP-зв'язану форму, використовуючи фосфоенолпіруват та його кіназу. Виявилось, що EF-Tu-GTP не впливає на активність валіл-тРНК синтетази навіть у концентрації, що була в чотири рази більше за концентрацію EF-1 α в аналогічному експерименті (рис.9). Отже, просто спорідненості до аміноацил-тРНК виявилось недостатньо для активації валіл-тРНК синтетази.

Одним із факторів, що має вплив на стимуляторний ефект EF-1 α , виявився ступінь збагачення сумарного препарату тРНК валіновою тРНК. При порівнянні препаратів тРНК, які містили 2.5% або 20,4% тРНК^{Val}, виявилось, що активація валіл-тРНК синтетази фактором елонгації спостерігається тільки при використанні збагаченого по тРНК^{Val} препарату сумарної тРНК (рис.10). Ми пояснюємо це явище 10-кратним зменшенням (з 22000 до 2500 пмоль на точку прямої) кількості деацильованої тРНК в збагаченому препараті. Якщо EF-1 α здатний формувати неканонічний комплекс з деацильованою тРНК (про що буде сказано нижче), її значний

надлишок в порівнянні з аміноацил-тРНК в системі призводить до того, що майже всі молекули фактора перебувають в комплексі з деацильованою тРНК, тобто не здатні впливати на активність валіл-тРНК синтетази за

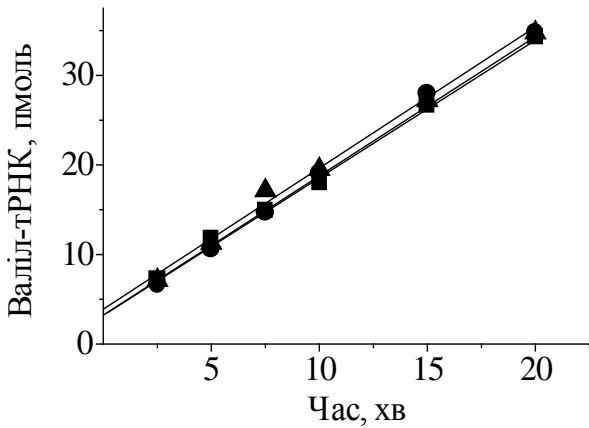


Рис.9 Швидкість синтезу валіл-тРНК валіл-тРНК синтетазою в комплексі з EF-1H в присутності бактеріального фактора елонгації EF-Tu. (□) - додано 50 пмоль EF-Tu/100 мкл, (△) - додано 200 пмоль EF-Tu/100 мкл, (○) - без EF-Tu. Концентрація валіл-тРНК синтетази - 1.7 нМ.

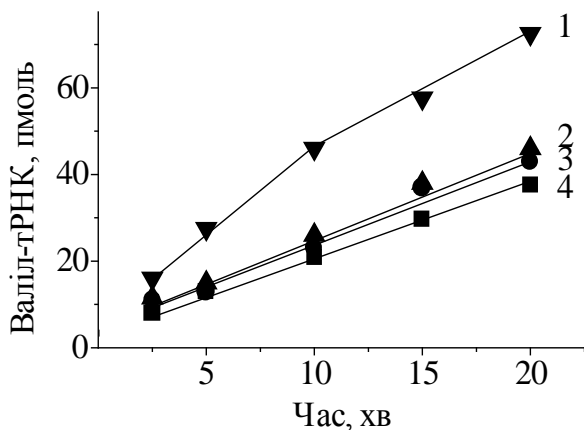


Рис. 10 Активність валіл-тРНК синтетази в присутності EF-1α (1,3) та без нього (2,4) при використанні як субстратів препаратів тРНК з різним вмістом тРНК^{Val}. В одному препараті тРНК містилося 20,4% тРНК^{Val} (1,2), в іншому - 2,5% тРНК^{Val} (3,4). Для збагаченого препарату кількість тРНК^{Val} на точку прямої була 13.1 мкг, для сумарного - 13.8 мкг.

комплексу з аміноацил-тРНК.

Іншим контролем було використання валіл-тРНК синтетази із дріжджів. Для цього ферменту раніше було встановлено, що стадією, яка лімітує швидкість, є дисоціація синтезованої аміноацил-тРНК. (Kern et al., 1981). Але додавання EF-1α, незважаючи на те, що цей білок має

високу спорідненість до аміноацил-тРНК, не впливало на синтез валіл-тРНК (рис.11) навіть у присутності βγ субодиниць EF-1H, які каталізують GDP/GTP обмін в молекулі EF-1α. Таким чином, можна зробити висновок, що прискорення синтезу валіл-тРНК валіл-тРНК синтетазою, яка знаходиться в комплексі з EF-1H, в присутності надлишку

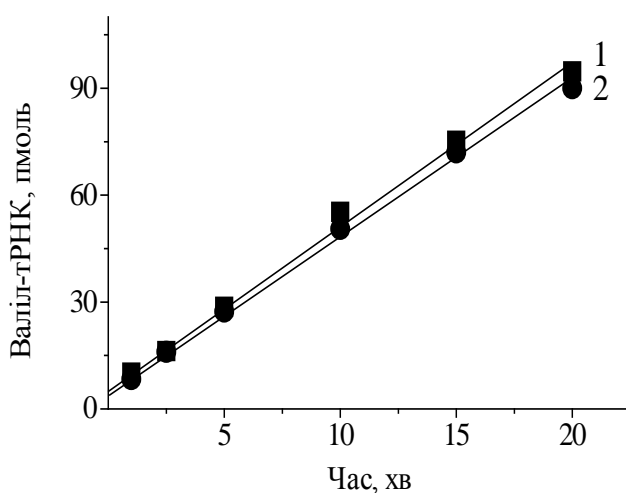


Рис.11. Активність валіл-тРНК синтетази з дріжджів в присутності (1) та без (2) EF-1 α . Концентрація валіл-тРНК синтетази - 1.6 нМ. Кількість EF-1 α 50 пмоль/100мкл суміші. Кінцева концентрація EF-1 $\beta\gamma$ - 31 нМ.

EF-1 α є специфічним для білків вищих еукаріот і може бути результатом білок-білкових взаємодій в цьому комплексі.

Які компоненти комплексу валіл-тРНК синтетаза - EF-1H важливі для забезпечення функціональної взаємодії EF-1 α з валіл-тРНК синтетазою? Для відповіді на це питання було доцільно провести дисоціацію комплексу і потім його реконструкцію в дослідах *in vitro* з окремих компонентів, вивчаючи вплив кожного з них на стимулюючий ефект EF-1 α . Раніш було показано, що валіл-тРНК синтетаза, частина N-кінцевого домена якої деградована еластазою, втрачає спорідненість до EF-1H, але залишається такою ж активною в аміноацилюванні (Вес et al, 1994). Ми продемонстрували, що EF-1 α ніяк не впливає на активність скороченої з N-кінця валіл-тРНК синтетази (рис.12а). Але не можна виключити, що N-кінцева частина молекули ферменту приймає участь у взаємодії з EF-1 α , тобто її видалення може призводити до втрати такої взаємодії, і отже до втрати стимулюючого впливу EF-1 α на активність валіл-тРНК синтетази. Тому після дисоціації комплексу було отримано нативну валіл-тРНК синтетазу і вивчено ефект EF-1 α на її активність. З рис. 12б видно, що EF-1 α не впливає і на активність дисоційованого з комплексу нативного ферменту навіть за присутності EF-1 $\beta\gamma$. Таким чином, асоціація валіл-тРНК синтетази з EF-1H абсолютно необхідна для функціональної взаємодії ферменту з EF-1 α . Питання про те, який з компонентів EF-1H є важливим для цієї взаємодії залишається відкритим, тому що ні EF-1 $\beta\gamma$, ні EF-1 δ , ні їх комбінація не мали ніякого впливу на активність індивідуальної валіл-тРНК синтетази як в присутності, так і без EF-1 α . Не змінювала загальної картини і зміна порядку добавлення різних субодиниць EF-1H при реконструкції комплексу. Необхідно зауважити, що згідно з літературними даними EF-1 δ має дуже велику здатність до самоагрегації та неспецифічної агрегації з іншими компонентами комплексу (Вес et al, 1994), і тому коректна реконструкція комплексу EF-1H з окремих компонентів може бути

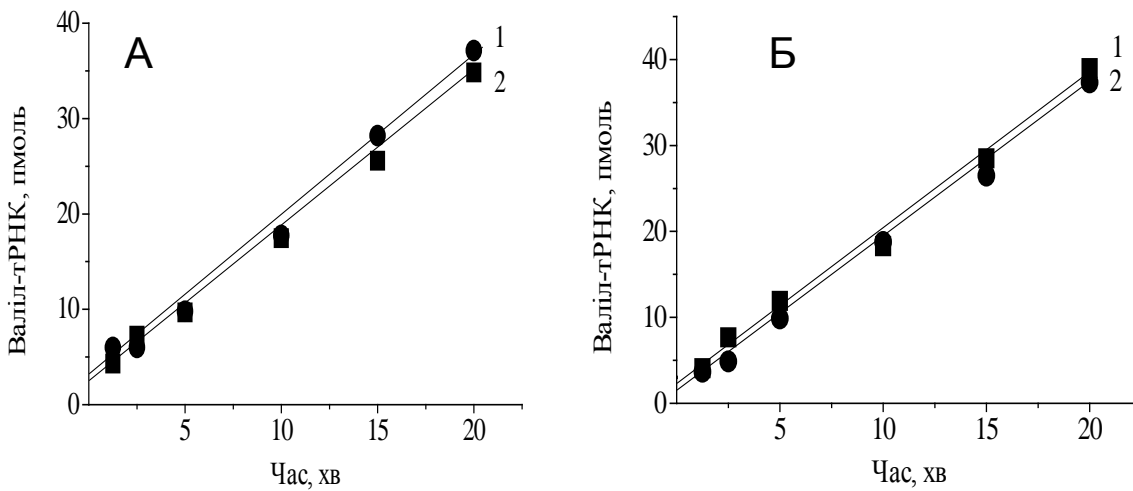


Рис.12 Активність індивідуальної валіл-тРНК синтетази без N-кінцевої частини молекули (А) та індивідуальної інтактної валіл-тРНК синтетази (Б) в присутності (1) та без (2) EF-1 α . Концентрація модифікованої валіл-тРНК синтетази – 2.5 нМ, інтактної - 2.7 нМ. 100 мкМ GTP і 110 нМ EF-1 β були присутні в кожній суміші. 50 пмоль EF-1 α було додано на 100 мкл інкубаційної суміші.

утруднена, якщо не неможлива. Оскільки нами було виявлено, що EF-1 δ значно чутливіший до дії еластази, ніж інші компоненти комплексу, альтернативним шляхом визначення можливої ролі EF-1 δ міг би бути частковий гідроліз еластазою комплексу валіл-тРНК синтетаза-EF-1H. Але і цей метод не дав чіткої відповіді. Отже, здається ймовірним, що для підтримання функціональної взаємодії валіл-тРНК синтетази з EF-1H є необхідним комплекс валіл-тРНК синтетаза-EF-1H як єдине ціле. Роль окремих компонентів EF-1H в забезпеченні безпосередньої передачі заново синтезованої валіл-тРНК від валіл-тРНК синтетази до EF-1 α потребує подальшого дослідження.

Таким чином нами встановлено феномен функціональної взаємодії фактора елонгації трансляції EF-1 α з валіл-тРНК синтетазою. Стимулювання активності синтетази фактором, очевидно, відбувається шляхом прискорення дисоціації синтезованої валіл-тРНК з ферменту за рахунок передачі цієї аміноацил-тРНК у потрібний комплекс EF-1 α -GTP-валіл-тРНК. Для здійснення такої взаємодії обов'язковим є комплексоутворення між валіл-тРНК синтетазою та EF-1H. Разом з тим нами було показано, що в клітинах ссавців ченелінг відбувається за участі більшості, якщо не всіх аміноацил-тРНК. Виникає питання, чи можна виявити в дослідах *in vitro* взаємодію EF-1 α із тими аміноацил-тРНК синтетазами, які не входять до складу різних високомолекулярних комплексів? Зробити це було вирішено на прикладі фенілаланіл-тРНК синтетази з печінки кроля.

Встановлено, що додавання EF-1 α -GDP до інкубаційної суміші призводило до двократного підвищення активності фенілаланіл-тРНК синтетази (рис.13). Каталітична

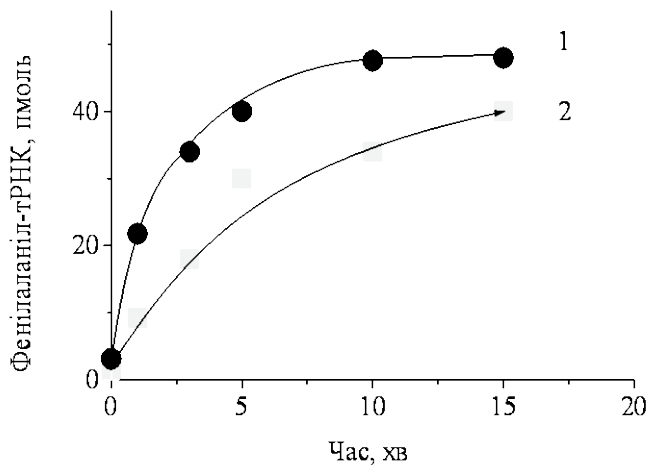


Рис.13. Активність фенілаланіл-тРНК синтетази з печінки кроля в присутності (1) та без (2) 50 пмоль EF-1α. Об'єм інкубаційної суміші – 50 мкл.

константа (k_{cat}) ферменту в присутності EF-1α (0.76 сек^{-1}) була в два рази вищою, ніж без нього (0.38 сек^{-1}). Слід особливо відзначити, що на відміну від валіл-тРНК синтетази,

активація фенілаланіл-тРНК синтетази відбувалася під дією GDP-форми EF-1α. Це дозволило припустити, що механізми стимулювання цих двох ферментів різні, і активація фенілаланіл-тРНК синтетази може бути не зв'язана з формуванням класичного потрійного комплексу аміноацил-тРНК-EF-1α-GTP, тобто з прискоренням дисоціації аміноацил-тРНК з ферменту, а відбуватися за рахунок фактор-синтетазної взаємодії на етапах до дисоціації синтезованої аміноацил-тРНК. Дійсно, залежність рівня активації від концентрації EF-1α була подібна до

сигмоїдальної, що є типовим для алостеричних взаємодій (рис.14). Це може

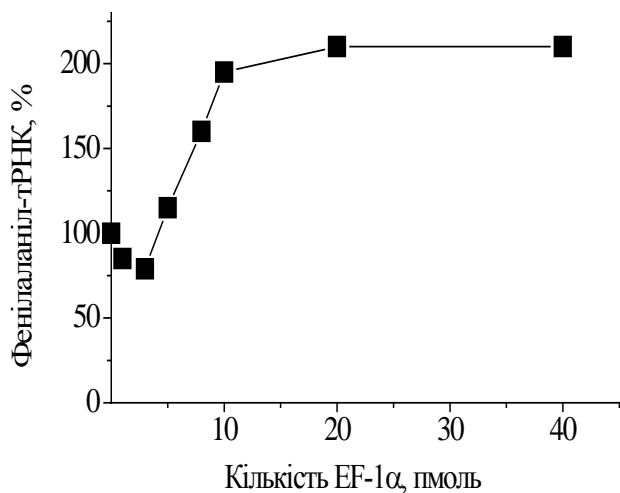


Рис.14 Активність фенілаланіл-тРНК синтетази в присутності різної кількості EF-1α. За 100% прийнято кількість фенілаланіл-тРНК (12 пмоль), синтезованої без участі EF-1α. Об'єм інкубаційної суміші – 50 мкл. Час інкубації – 2,5 хв.

свідчити на користь безпосередньої взаємодії фенілаланіл-тРНК з EF-1α. Про специфічність ефекту активації свідчить незмінність ферментативної активності в присутності сироваткового альбуміну бика та прокаріотичного фактора елонгації трансляції EF-Tu. Для перевірки припущення про те, що фактор EF-1α впливає на першу стадію реакції аміноацильовання, було вивчено його дію на АТР-пірофосфатний обмін, який каталізує фенілаланіл-тРНК синтетаза. Встановлено, що швидкість цієї реакції також стимулюється фактором елонгації EF-1α (рис.15).

Спостерігалася також S-образність кривої залежності активності синтетази в реакції АТР/РРі обміну від концентрації EF-1 α .

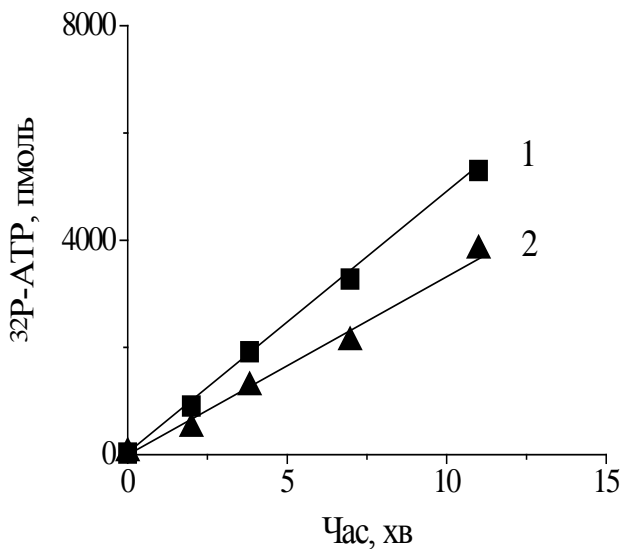


Рис.15 Швидкість АТР-пірофосфатного обміну, що каталізує фенілаланіл-тРНК синтетаза, в присутності (1) та без (2) 50 пмоль EF-1 α . Об'єм інкубаційної суміші - 100 мкл.

Таким чином, можна зробити висновок, що стимуляторний ефект EF-1 α не пов'язаний з прискоренням дисоціації аміноацил-тРНК, як у випадку валіл-тРНК синтетази. Цілком ймовірно, що взаємодія фактор-синтетаза або фактор - тРНК - синтетаза веде до зміни конформації фенілаланіл-тРНК синтетази, яка стає більш сприятливою до синтезу фенілаланіладенілата, прискорюючи таким чином і загальну швидкість аміноаціювання. Говорячи про можливі механізми стимуляції слід вказати, що для фенілаланіл-тРНК синтетаз із дріжджів та *E.coli* швидкість-лімітуючими етапами є якісь процеси, що відбуваються до дисоціації аміноацил-тРНК з ферменту (Fasiolo et al, 1978, Baltzinger et al, 1982, Dibbelt et al, 1981). Це свідчить на користь нашого висновку про природу стимуляції фактором фенілаланіл-тРНК синтетази. Оскільки цей ензим має чотири субодиниці та два активних центри, та беручи до уваги, що в літературі вже було висунуто припущення щодо можливості кооперативної взаємодії між каталітичними центрами субодиниць (Dibbelt et al, 1981), не є несподіваним сигмоїдальний характер кривої впливу концентрації EF-1 α на синтез фенілаланіл-тРНК і на АТР-пірофосфатний обмін, що каталізує фенілаланіл-тРНК синтетаза.

Таким чином, EF-1 α -GDP може взаємодіяти з фенілаланіл-тРНК синтетазою ще до аміноаціювання тРНК та під час цього процесу. Яке функціональне значення цієї взаємодії? В наведеній раніше схемі ченелінга фактора елонгації 1 α в GTP-формі відводилася роль акцептора аміноацил-тРНК після її синтезу аміноацил-тРНК синтетазою (див. рис.5). Суттєві докази на користь цього механізму отримані нами на прикладі валіл-тРНК синтетази. Стимуляція фенілаланіл-тРНК синтетази, очевидно, не є наслідком функціонування цього механізму, бо відбувається на стадіях до дисоціації аміноацил-тРНК з ферменту. Одним з найменш з'ясованих моментів у схемі ченелінга тРНК в білковому синтезі є шлях між E сайтом рибосом та аміноацил-тРНК синтетазами. Нещодавно було отримано дані, про те, що деацильована тРНК, так само як і аміноацил-тРНК, не є вільною у клітині, а завжди знаходиться в комплексі з клітинними структурами (Stapulionis et al, 1995). Розвиваючи гіпотезу ченелінга, ми запропонували, що EF-1 α , який знаходиться в GDP-формі після гідролізу GTP під час взаємодії

аміноацил-тРНК з А сайтом рибосоми, здатний зв'язувати деацильовану тРНК в Е сайті рибосоми, дисоціювати з рибосоми у складі потрійного комплексу EF-1 α -GDP-тРНК та переносити тРНК до аміноацил-тРНК синтетази. В цьому випадку виявлена стимуляція GDP-формою EF-1 α першої стадії реакції аміноацилювання тРНК може бути простим відзеркаленням взаємодії неканонічного потрійного комплексу з аміноацил-тРНК синтетазою. Певна річ, що це не виключає можливості взаємодії фактора із синтетазою і після синтезу аміноацил-тРНК.

Для доказу цієї гіпотези в першу чергу необхідно показати існування неканонічного потрійного комплексу EF-1 α *GDP*тРНК. Ряд непрямих спостережень, що вказували на досить велику ймовірність формування такого комплексу, вже були зроблені в цій роботі. Але можливість утворення комплексу EF-1 α *GDP*тРНК була вперше прямо доказана нами методом мембранної фільтрації. Одночасно було підтверджено можливість утворення комплексу EF-1 α *GTP*тРНК. Комплекс EF-1 α *GDP*тРНК було охарактеризовано флуоресцентним аналізом. Вивчалася флуоресценція п'яти триптофанілових залишків в молекулі EF-1 α , яка може змінюватися при формуванні комплексу з тРНК. Дійсно, спостерігалася збільшення інтенсивності сигналу вже в присутності удвічі меншої кількості тРНК, ніж кількість фактора (рис.16а). Цікаво, що підвищення інтенсивності можна було

Рис. 16. Вплив тРНК на інтенсивність і положення спектра триптофанової флуоресценції EF-1 α -GDP (A,C) та триптофанового похідного NaTa в кількості, що була еквімолярною кількості триптофанілових залишків в EF-1 α (B, D). Для більш чіткої ілюстрації спектрального зсуву дані (C, D) були нормалізовані по максимальній інтенсивності.

реєструвати навіть на фоні неспецифічного зменшення рівня флуоресценції за рахунок адсорбції світла молекулами тРНК (рис.16b). Таким чином, реальний вплив тРНК на ендогенну флуоресценцію був дещо більшим, ніж детектувалося в експерименті, проведеному без урахування здатності тРНК поглинати світло. Зростання інтенсивності флуоресценції відображає зміну оточення флуорофорів в молекулі EF-1 α , тобто може свідчити про конформаційну перебудову білка при утворенні комплексу з тРНК. Більш однозначним свідченням формування такого комплексу, не зв'язаним з можливими артефактами за рахунок світлопоглинання тРНК, може бути зсув максимуму спектра ендогенної флуоресценції білка при добавленні тРНК. Дійсно, в контрольному експерименті не спостерігалася ніякого впливу тРНК на положення максимуму флуоресценції модельного пептиду NaTa, (рис. 16d), у той час, коли та ж концентрація тРНК спричиняла помітний (2нм) зсув максимуму флуоресценції EF-1 α у бік збільшення довжини хвилі (рис. 16с).

Отже, зміна положення максимуму та інтенсивності флуоресценції EF-1 α в присутності тРНК недвозначно свідчить про зміну конформації фактора елонгації в комплексі з тРНК. А що

відбувається з молекулою тРНК в такому комплексі? Відповідь на це питання було отримано за допомогою методів РНКазного гідролізу та хімічної модифікації тРНК різної специфічності. Картина гідролізу тРНК^{Phe} в присутності EF-1 α -GDP нуклеазою отрути кобри показана на рис. 17А. Виявлено, що EF-1 α -GDP захищає від дії РНКаз нуклеотиди в 68 та 69 положенні акцепторного стебла молекули тРНК. Крім того, присутність EF-1 α призводить до появи нових розривів в позиції 66 акцепторного стебла і в позиціях 73 та 74 ССА-кінця молекули. Цікаво, що при заміні EF-1 α -GDP на EF-1 α -GTP не відбувається індукції нових розривів або захисту інших нуклеотидів в молекулі тРНК. На рис.17Б показано результати гідролізу тРНК^{Leu} РНКазою T₁. В присутності EF-1 α спостерігається підсилення гідролізу молекули тРНК після G57 ТПС петлі та G70 акцепторного стебла, а також деяке підсилення розривів на 3' стороні варіабельної петлі. Останнє може бути специфічним для довгопетельних тРНК, до класу яких належить тРНК^{Leu}. Дія РНКаз Р1, яка специфічна до односпіральних ділянок молекули тРНК, була однаковою як в присутності, так і без EF-1 α , тобто цілком ймовірно, що більшість односпіральних частин молекули тРНК не беруть участі у взаємодії з EF-1 α .

На рис.18 представлено результати хімічної модифікації тРНК^{Phe} етилнітрососечовиною. EF-1 α специфічно захищає від алкілювання 3'фосфатні групи нуклеотидів G52, G53, A58, U68 та C69, тобто частини акцепторного стебла, ТПС-петлі та ТПС-стебла тРНК^{Phe}. Узагальнюючи дані РНКазного гідролізу та хімічної модифікації, можна зробити висновок, що ці результати прямо підтверджують утворення комплексу EF-1 α -GDP-тРНК, та дозволяють ідентифікувати сайти тРНК, які приймають участь у взаємодії з EF-1 α (рис.19). Індукція нових сайтів гідролізу та посилення деяких існуючих розривів свідчить про певні конформаційні зміни молекули тРНК під час взаємодії з EF-1 α . Вартим

Рис.17. А - електрофореграма ³²P-тРНК^{Phe}, гідролізованої нуклеазою отрути кобри (НОК) в присутності EF-1 α . 1 – піперидиновий гідроліз, 2,6 - контролі без РНКаз, інкубація тРНК (2) або тРНК+EF-1 α (6), 3 – обмежений гідроліз T₁ РНКазою тРНК^{Phe}, 4 – гідроліз НОК тРНК^{Phe}, 5 – гідроліз НОК тРНК^{Phe} в комплексі з EF-1 α -GDP, 7 – гідроліз НОК тРНК^{Phe} в комплексі з EF-1 α -GTP, 8 – гідроліз НОК тРНК^{Phe} в присутності овальбуміна. Б - електрофореграма ³²P-тРНК^{Leu}, гідролізованої в присутності EF-1 α -GDP рибонуклеазою T₁. 1 – гідроліз даної тРНК в присутності 7М сечовини при 55⁰С, 2 – гідроліз тРНК без добавок, 3, 5 – контрольна інкубація тРНК (3) та тРНК в присутності EF-1 α -GDP (5) без РНКаз, 4, 6 - гідроліз тРНК рибонуклеазою T₁ в присутності EF-1 α -GDP (4) або овальбуміна (6) відповідно.

уваги є те, що переведення молекули EF-1 α у GTP-форму, хоч і супроводжувалося деякою зміною амплітуди протекторної дії цього білка на гідроліз тРНК нуклеазою отрути кобри, але не викликало появи нових сайтів захисту і нових сайтів гідролізу тРНК. Це може свідчити

Рис.18 Порівняння доступності етилнітрососечовині фосфатних груп тРНК^{Phe} в присутності EF-1 α -GDP та без нього. Величина R є співвідношенням між інтенсивністю відповідних електрофоретичних смуг алкілованої тРНК^{Phe} в присутності EF-1 α -GDP та без

нього. Зміни в доступності фосфатних груп тРНК алкілуванню вважалися істотними, якщо значення R відхилялося від 1 більш ніж на 35%.

Рис.19 Ділянки тРНК^{Phe}, які захищені EF-1 α від нуклеазного гідролізу та від хімічної модифікації (великі трикутники), та місця посиленого РНКазного гідролізу в присутності EF-1 α (малі трикутники).

про подібну конформацію молекули тРНК під час її взаємодії з GDP- або з GTP- формами фактора.

Для з'ясування просторової організації комплексу EF-1 α -GDP-тРНК ми використали вже відому за даними рентгеноструктурного аналізу структуру класичного потрійного комплексу прокариотичного фактора елонгації EF-Tu, аналога GTP та фенілаланіл-тРНК дріжджів (Nissen et al, 1995). При накладанні на цю структуру визначених нами сайтів деацильованої тРНК, що беруть участь у взаємодії з фактором, було виявлено практично повний їх збіг з ділянками молекули аміноацил-тРНК, які приймають участь у взаємодії з прокариотичним фактором в кристалі комплексу (рис.20). Цікаво, що такий збіг спостерігається незважаючи на те, що порівнюються комплекс тРНК з GDP-формою

*Рис.20. Схематичне зображення просторової структури потрійного комплексу EF-1 α *GDP * тРНК.*

На відомій просторовій структурі фенілаланіл-тРНК у складі потрійного комплексу з прокариотичним фактором EF-Tu та GMPPNP показано сайти взаємодії деацильованої тРНК^{Phe} з еукаріотичним фактором EF-1 α . Кругами позначені місця захисту тРНК, стрілками – місця посилення гідролізу тРНК в присутності EF-1 α .

еукаріотичного фактора та комплекс аміноацил-тРНК із GTP-формою прокариотичного фактора. Отже, існує досить велика ймовірність існування в молекулі EF-1 α спільного сайту для зв'язування аміноацил-тРНК і тРНК, або часткового перекриття цих сайтів.

Літературні дані свідчать про відсутність значної конформаційної різниці між GTP- та GDP- формами EF-1 α (van Damme et al, 1992). Ми, в свою чергу, не виявили істотної різниці між ділянками взаємодії тРНК з GTP- та GDP- формами EF-1 α . В такому разі визначені нами сайти взаємодії тРНК з EF-1 α напевно будуть вірними і для класичного потрійного комплексу EF-1 α *GTP*аміноацил-тРНК, тобто отримані результати є фактично першими, що дають певну інформацію про ділянки тРНК, які приймають участь в формуванні класичного потрійного

комплексу аміноацил-тРНК*EF-1 α *GTP. Отже, ці результати є дуже важливими і з точки зору розуміння подробиць загального механізму елонгації поліпептидного ланцюга у вищих еукаріот.

Таким чином, підтверджено утворення неканонічного потрійного комплексу EF-1 α *GTP*тРНК. Але чи може тРНК в такому комплексі переноситися до аміноацил-тРНК синтетази, як запропоновано в нашій моделі ченелінга? Для доказу цього необхідно було довести формування четвертинного комплексу EF-1 α *GDP*тРНК-аміноацил-тРНК синтетаза. Порівнюючи відомі просторові структури комплексу фенілаланіл-тРНК синтетази (*Th. termophilus*) з тРНК^{Phe} (Goldgur et al, 1997) та комплексу EF-Tu*GMPPNP*фенілаланіл-тРНК (Nissen et al, 1995), можна пересвідчитися у тому, що немає стеричних перешкод для утворення четвертинного комплексу. Для прямої експериментальної перевірки можливості існування такого комплексу було застосовано метод “затримки у гелі”, який базується на зміні рухливості нуклеїнової кислоти протягом її електрофорезу в присутності білків, до яких вона має спорідненість (Sioud et al, 1996). Було використано електрофорез в агарозі, який дозволяв рухатися досить великим макромолекулярним комплексам при показниках рН, що незначно відрізнялися від їх ізоелектричної точки. Електрофореграма на рис. 21 дозволяє оцінити утворення різних комплексів тРНК^{Phe}. Видно, що спостерігається затримка руху ³²P-тРНК^{Phe} як наслідок утворення комплексу з EF-1 α -GDP або з фенілаланіл-тРНК синтетазою.

*Рис. 21 Утворення четвертинного комплексу EF-1 α *GDP*тРНК^{Phe}*фенілаланіл-тРНК синтетаза. Наведено результати електрофорезу в 0.7% агарозном гелі. 1 – тРНК, 2 – EF-1 α -GDP та тРНК, 3 – фенілаланіл-тРНК синтетаза та тРНК, 4 - EF-1 α -GDP, фенілаланіл-тРНК синтетаза та тРНК.*

Найбільш вагомим є той факт, що при змішуванні EF-1 α -GDP, фенілаланіл-тРНК синтетази та тРНК^{Phe} відбувається очевидний зсув смуги тРНК в ще більш “високомолекулярну” зону геля, що свідчить про утворення четвертинного комплексу EF-1 α *GDP*тРНК^{Phe}*фенілаланіл-тРНК синтетаза. Цікаво, що EF-1 α *GDP*тРНК не утворює четвертинний комплекс ні з гліцеральдегідфосфатдегідрогеназою, яка має такий же заряд (pI \approx 8.0), ані з каталазою, яка має таку ж молекулярну масу (240 Кда) як фенілаланіл-тРНК синтетаза. Це свідчить про специфічність утворення комплексу EF-1 α *GDP*тРНК^{Phe}*фенілаланіл-тРНК синтетаза. Отже, підтверджено наше припущення, що причиною стимуляторної дії EF-1 α на активність фенілаланіл-тРНК синтетази є формування комплексу фактора і ферменту ще до початку аміноаціювання. Такий комплекс може впливати на взаємодію між активними центрами фенілаланіл-тРНК синтетази, прискорюючи стадію синтезу фенілаланіладенілату, і крім того забезпечувати оптимальну орієнтацію молекули тРНК по відношенню до активного центра ензиму.

Концепція функціональної компартменталізації білкового синтезу у вищих еукаріот. Узагальнюючи картину, можна зробити висновок про існування двох шляхів передачі тРНК між аміноацил-тРНК синтетазою і EF-1 α . Деацильована тРНК передається від EF-1 α -GDP до аміноацил-тРНК синтетази (показано на прикладі фенілаланіл-тРНК синтетази), а аміноацил-тРНК передається від аміноацил-тРНК синтетази до EF-1 α -GTP (показано на прикладі валіл-тРНК синтетази). Беручи це до уваги, ми пропонуємо таку модель функціонування апарату трансляції в режимі ченелінга тРНК (рис.22). EF-1 α є човником між рибосомами і гіпотетичним макромолекулярним комплексом, який містить

Рис. 22 Гіпотетична модель структурно-функціональної організації трансляційного компартмента

аміноацил-тРНК синтетази та EF-1H. За допомогою EF-1 α відбувається безпосереднє перенесення аміноацил-тРНК від цього комплексу до рибосоми та перенесення деацильованої тРНК від рибосоми до цього комплексу. EF-1 α -GTP працює в напрямку “аміноацил-тРНК синтетаза - рибосома”, EF-1 α -GDP – в напрямку “рибосома - аміноацил-тРНК синтетаза”. В цій моделі ченелінг аміноацил-тРНК/тРНК забезпечується мікрокомпартменталізацією EF-1 α , аміноацил-тРНК синтетаз, EF-1H, рибосом та мРНК в клітині. Дуже цікаво, що з моделі виникає можливість співкомпартменталізації мРНК та пула тРНК з антикодонами, які відповідають кодонам мРНК на цій ділянці (на рис.22 представлено стрілками), що дозволяє запропонувати якісно новий підхід до з'ясування причин високої точності трансляції в еукаріотичних клітинах.

Отже, результати наших експериментів свідчать про наявність в клітинах ссавців, крім структурної, ще й функціональної компартменталізації апарату білкового синтезу. Функціональна компартменталізація – це формування трансляційних компартментів, яке необхідне для оптимального функціонування апарату білкового синтезу в клітинах вищих еукаріот. Базуючись на власних та літературних даних ми пропонуємо таке визначення трансляційного компартмента. Трансляційний компартмент – це сукупність (ансамбль) макромолекулярних комплексів, які утворюються та розпадаються під час трансляції мРНК на рибосомах в обмеженому клітинному просторі. До складу компартмента входять тРНК, аміноацил-тРНК синтетази, фактори елонгації, ряд інших білків, таких, наприклад, як несинтезні компоненти високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз, а також мРНК та рибосоми. Функціональне значення трансляційного компартмента головним чином полягає в забезпеченні можливості прямої передачі субстратів білкового синтезу, зокрема деацильованої тРНК та аміноацил-тРНК, від одного комплексу до іншого в ланцюзі послідовних реакцій під час трансляції мРНК. Структурною основою формування трансляційних компартментів окрім компонентів білок-синтезуючого апарату можуть бути актинові філаменти цитоскелету, а також мембрани шорсткого ендоплазматичного ретикулуму.

У клітині трансляційні компартменти організовані таким чином, що доступ екзогенних тРНК, які не знаходяться в цей час в комплексі з білками, усередину компартмента є утрудненим. Це відбувається тому, що аміноацил-тРНК і тРНК постійно перебувають у фізичному зв'язку з

будь-яким із трансляційних комплексів. Водночас утруднений і вихід назовні ендогених тРНК, які вже функціонують в компартменті. Трансляційний компартмент являє собою досить лабільне утворення і може частково або повністю розпадатися при повному завершенні трансляції даної мРНК чи за несприятливих зовнішніх умов, які викликають зупинку білкового синтезу.

ВИСНОВКИ.

1. Певне теоретичне уявлення про можливість компартменталізації апарату білкового синтезу вищих еукаріот не було підтверджено на початок наших досліджень ніякою експериментальною інформацією щодо функціонального значення цього феномену. В представленій дисертації отримано ґрунтовні експериментальні дані, які дозволили розробку концепції функціональної компартменталізації апарату трансляції та гіпотетичної моделі структурно-функціональної організації трансляційного компартменту. Вперше запропоновано схему ченелінга тРНК/аміноацил-тРНК, яка детально описує різні варіанти передачі тРНК під час синтезу поліпептидного ланцюга. Показано потенційне регуляторне значення функціональної компартменталізації, у тому числі запропоновано її можливу роль в забезпеченні точності трансляції в клітинах вищих еукаріот.

2. Вперше розроблено та використано систему спряженої пермеабілізації-трансляції в клітинах тварин та людини, що забезпечує таку ж швидкість білкового синтезу, як і інтактні клітини. Розроблено методи виділення фактора елонгації 1α та фенілаланіл-тРНК синтетази з печінки кроля.

3. Виявлено структурно-функціональну компартменталізацію аміноацил-тРНК в клітинах вищих еукаріот:

а) в експериментах з подвійною міткою показано, що ендогенна аміноацил-тРНК не виходить назовні з пермеабілізованих клітин китайського хом'ячка, тоді як розподіл екзогенно доданої аміноацил-тРНК між клітинним та позаклітинним просторами є пропорційним об'ємам цих просторів;

б) встановлено, що ендогенна аміноацил-тРНК, на відміну від екзогенно доданої, захищена від гідролізу добавленою зовні РНКазою в пермеабілізованих клітинах;

в) виявлено, що додана зовні аміноацил-тРНК не може ефективно використовуватись апаратом трансляції пермеабілізованих клітин, в той час, коли ендогенна аміноацил-тРНК бере активну участь в трансляції.

4. На прикладі пермеабілізованих фібробластів людини показано можливість залежного від вмісту макроергів розпаду трансляційних компартментів:

а) методом флуоресцентної мікроскопії продемонстровано зміну внутрішньоклітинної локалізації фактора елонгації EF-1 α в залежності від фосфокреатину;

б) не виявлено впливу фосфокреатину на локалізацію іншої субодиниці фактора елонгації EF-1 δ ;

в) запропоновано існування нового рівня регуляції білкового синтезу – шляхом асоціації-дисоціації трансляційних компартментів;

г) припущено, що одним із посередників в такому типі регуляції є неактивні конформери тРНК, які утворюються в організмі за екстремальних умов та мають інгібіторний вплив на трансляцію мРНК.

5. Визначено функціональну роль стабільного комплексу валіл-тРНК синтетаза-EF-1H в клітинах вищих еукаріот:

а) показано, що EF-1 α -GTP стимулює початкову швидкість синтезу валіл-тРНК валіл-тРНК синтетазою, яка перебуває в комплексі з мультисубодиничною формою фактора елонгації EF-1 (EF-1H). Відсутність ефекту GDP-форми фактора свідчить про участь в механізмі стимуляції класичного потрійного комплексу EF-1 α *GTP*аміноацил-тРНК;

б) продемонстровано специфічність функціональної взаємодії EF-1 α з валіл-тРНК синтетазою для білків вищих еукаріот;

в) виявлено абсолютну необхідність перебування валіл-тРНК синтетази в комплексі з EF-1H для її функціональної взаємодії з EF-1 α , що свідчить про визначальну роль цього комплексу в забезпеченні ченелінга валіл-тРНК.

6. Запропоновано і експериментально доведено можливість прямої передачі деацильованої тРНК від EF-1 α до аміноацил-тРНК синтетази:

а) продемонстровано істотний стимуляторний ефект EF-1 α -GDP на активність фенілаланіл-тРНК синтетази в активації амінокислоти та аміноацилюванні тРНК;

б) різними методами доказано утворення неканонічного потрійного комплексу EF-1 α *GDP*тРНК;

в) продемонстровано утворення четвертинного комплексу EF-1 α *GDP*тРНК*фенілаланіл-тРНК синтетаза.

7. Розроблено концепцію функціональної компартменталізації білок-синтезуючого апарату вищих еукаріот та гіпотетичну модель структурно-функціональної організації трансляційного компартменту. Зокрема, висунуто експериментально обгрунтоване положення про протилежно направлену дію комплексів EF-1 α -GDP та EF-1 α -GTP в доставці тРНК від рибосоми до аміноацил-тРНК синтетази та доставці аміноацил-тРНК від аміноацил-тРНК синтетази до рибосоми відповідно.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Negrutskii B.S., Deutscher M.P. Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo*. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1991. - 88. - P. 4991-4995.

2. Negrutskii B.S., Deutscher M.P. A sequestered pool of aminoacyl-tRNA in mammalian cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1992. - 89. - P. 3601-3604.

3. Negrutskii B. S., Stapulionis R., Deutscher M.P. Supramolecular organization of the mammalian translation system. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1994. - 91. - P. 964-968.
4. Negrutskii B.S., Budkevich T.V., Shalak V.F., Turkovskaya G.V., El'skaya A.V. Rabbit translation elongation factor 1α stimulates the activity of homologous aminoacyl-tRNA synthetase // FEBS Lett. - 1996. - 382. - P.18-20.
5. Petrushenko Z.M., Negrutskii B.S., Ladokhin A.S., Budkevich T.V., Shalak V.F., El'skaya A.V. Evidence for the formation of an unusual ternary complex of rabbit liver EF- 1α with GDP and deacylated tRNA. // FEBS Lett. - 1997. - 407. - P. 13-17.
6. Negrutskii B.S., El'skaya A.V. Eukaryotic translation elongation factor 1α : structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. // Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. - 1998. - 60. - P. 47-78.
7. Negrutskii B.S., Shalak V.F., Kerjan P., El'skaya A.V., Mirande M. Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF- 1α in the complex with EF-1H. // J. Biol. Chem. - 1999. - 274. - P.4545-4550.
8. Негруцкий Б.С. Транспортная РНК как фактор регуляции белкового гомеостаза. // Биополимеры и клетка. - 1989. - 5. - №5. - С. 5-18.
9. Негруцкий Б.С. Мягкий и эффективный метод пермеабилзации клеток животных и человека. // Биополимеры и клетка. - 1997. - 13. - №1. - С. 70-74.
10. Негруцкий Б.С. Влияние фосфокреатина на распределение различных субъединиц фактора элонгации трансляции 1 в пермеабилзированных фибробластах человека. // Биополимеры и клетка. - 1997. - 13. - №5. - С. 380-385.
11. Негруцкий Б.С. Цитоскелет и факторы элонгации трансляции. // Биополимеры и клетка. - 1997. - 13. - №6. - С. 436-441.
12. Негруцкий Б.С. Ченелинг в белковом синтезе. // Биополимеры и клетка. - 1998. - 14. - №3. - С. 177-183.
13. Shalak V.F., Budkevich T.V., Negrutskii B. S., El'skaya A.V. A fast and effective method for purification of elongation factor 1α from rabbit liver. // Укр. біохім. журн. - 1997. - 69. - №2. - С. 104-109.
14. Шалак В.Ф., Турковская Г.В., Семенихин К.А., Негруцкий Б. С. Экспресс-метод для выделения фенилаланил-тРНК синтетазы из печени кролика. // Биополимеры и клетка. - 1994. - 11. - №1. - С. 24-27.
15. Негруцкий Б. С., Ельская А.В. Влияние различных конформеров тРНК на трансляцию мРНК в бесклеточных системах. // Укр. біохім. журнал.-1989.-61.-№3.- С. 58-62.
16. Negrutskii B.S., El'skaya A.V. The interaction between biologically inactive tRNA conformers and leucyl-tRNA synthetase from rabbit liver. // Eur. J. Biochem.-1987.-164.- P. 56-59.
17. Негруцкий Б.С., Ельская А.В. Взаимодействие различных конформеров деацилированной тРНК с 80S рибосомами. // Биополимеры и клетка.-1987.-3.-№3.- С. 131-134.
18. Негруцкий Б.С. Препаративное получение рибосомальных субчастиц из печени кролика. // Структура и генетические функции биополимеров.-Киев.-Наук.думка.-1981.-С. 36-38.
19. Негруцкий Б.С. Система сопряженной пермеабилзации-трансляции в клетках животных и человека // Молекулярная генетика и биотехнология. - Минск.- 1998.-С. 236-238.

20. Роднина М.В, Негруцкий Б.С. Деацилированная тРНК и контроль трансляции // Материалы школы-конференции “Структура и функция биополимеров”. - Львов. - 1988. - С.88.

21. El'skaya A., Negrutskii B., Turkovskaya G., Ovcharenko G., Shalak V., Palchevskii S., Budkevich T. Specific features of higher eukaryotic translation machinery // Proc. International Conf. “Frontiers in translation”. - Victoria (Canada). - 1995. - P.168.

22. Negrutskii B., Shalak V., Budkevich T., El'skaya A. Functional interaction between translation elongation factor 1 and phenylalanyl-tRNA synthetase from rabbit liver // Proc. International Conf. “Frontiers in translation”. - Victoria (Canada). - 1995. - P.169.

23. Negrutskii B., Budkevich T., Shalak V., Turkovskaya G., El'skaya A. Elongation factor 1 α from rabbit liver stimulates homologous phenylalanyl-tRNA synthetase // Abstr.of 16th Intern. tRNA Workshop. - Madison (USA). - 1995. - P. 185.

24. Petrushenko Z.M., Negrutskii B.S., Budkevich T.V., Shalak V.F., El'skaya A.V. Similar sites of tRNA molecule are involved in [tRNA^{EF-1 α} GDP] and [aminoacyl-tRNA^{EF-Tu}GDPNP] complexes. // Abstr. of 17th Inter. tRNA Workshop. - Shiba (Japan). -1997. - P.8-26.

25. Negrutskii B.S. The effect of phosphocreatine on the distribution of different subunits of translation elongation factor 1 in gently permeabilized human fibroblasts. // Abstr. of 17th Inter. tRNA Workshop. - Shiba (Japan). -1997. - P.8-17.

26. Negrutskii B.S., Shalak V.F., Kerjan P., El'skaya A.V., Mirande M. Channeling of aminoacyl-tRNA in the valyl-tRNA synthetase:EF-1H complex // Abstr. of EMBO Workshop on Structure and Function of aminoacyl-tRNA synthetases. - Mittelwihr(France). - 1998. - P.114.

27. El'skaya A.V., Petrushenko Z.M., Negrutskii B.S., Budkevich T.V., Shalak V.F. Eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases and EF-1 α as possible partners in tRNA channeling // Abstr. of EMBO Workshop on Structure and Function of aminoacyl-tRNA synthetases. - Mittelwihr(France). - 1998. - P.40.

Negrutskii B. S. Functional compartmentalization of the mammalian translation machinery. – Manuscript. Thesis for Doctor of Biology degree. Speciality 03.00.03 - Molecular biology. Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1999.

Functional compartmentalization of the protein synthetic machinery in higher eukaryotes was studied using permeabilized with saponin or electroporated cells. For the first time the system of coupled permeabilization-translation was developed for CHO cells and human fibroblasts demonstrating the same efficiency of translation process in intact and permeabilized cells. A possibility of compartmentalization of aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) in CHO cells was tested by studying aa-tRNA distribution between intracellular and extracellular spaces of permeabilized cells. In double-label experiments 25-fold retardation inside permeabilized cells was observed for endogenous aa-tRNA while the ratio of exogenous aa-tRNA present inside and outside was similar to that of intracellular and extracellular volumes. Moreover, cellular aa-tRNA was protected against action of added RNase A while exogenous aa-tRNA was easily hydrolysed by RNase inside the cells. After homogenization of the cells no protection of endogenous aa-tRNA against RNase was found. Thus, both distribution and RNase protection experiments show structural compartmentalization of cellular aminoacyl-tRNA.

One of the important mechanisms to realize potential advantages of compartmentalization may be channeling, or direct transfer of intermediates from one component to another in a metabolic chain. Besides the need for some structural organization, another evidence of channeling mechanism is the impossibility of exogenous intermediates to enter a channeled pathway. Thus, the level of utilization of cellular and exogenously added aa-tRNA for protein synthesis in perforated cells was studied. Contrary to a cell-free system, in which no advantage was found, about 15-fold preference for cellular aa-tRNA was detected in permeabilized cells, i.e. endogenous aa-tRNA was much more efficient precursor, than exogenous aa-tRNA, for protein biosynthesis.

Thus, both structural and functional criteria for channeling are fulfilled in eukaryotic protein synthesis. We suggested that channeling of tRNA occurs in some labile structures – translational compartments which are destroyed during homogenization. To obtain the information about such compartments, namely, about possible changes in their organization under different cell conditions, the fluorescently labeled α and δ subunits of elongation factor 1 (EF-1) were used as compartment markers. Distribution of proteins in permeabilized human fibroblasts VH25 was compared under regular and low energy (no phosphocreatine) conditions. The absence of phosphocreatine in the incubation mixture was shown to cause almost complete stop of translation. The same granular EF-1 δ localization in cytoplasm was found under normal and low-energy conditions while the cytoplasmic distribution of EF-1 α was more granular under normal conditions (resembling that of EF-1 δ) and was much more nucleus-concentrated under low energy conditions. Thus, it is shown that involvement of the important component of translation apparatus - EF-1 α - into suggested translational compartments may depend on the efficacy of protein biosynthesis in cell. Difference in EF-1 α and EF-1 δ localization under low energy conditions may reflect different levels of immobilization of these proteins inside the cells, as earlier suggested. As far as we know these data are the first to reveal the correlation between depletion of energetic compound and the altered localization of a translation machinery component in eukaryotic cells.

The possibility of aminoacyl-tRNA synthetase-EF-1 α interaction, suggested by channeling hypothesis, was studied in vitro using rabbit liver EF-1 α , phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS) and valyl-tRNA synthetase (ValRS)-EF-1H complex. EF-1 α caused 2-fold stimulation of both valyl-tRNA and phenylalanyl-tRNA formation. The stimulation was rather specific since BSA and bacterial factor EF-Tu had no stimulatory capacity. Nevertheless, the mechanisms of EF-1-induced stimulation were quite different for two synthetases. Stimulation of ValRS required GTP strongly suggesting classical ternary complex valyl-tRNA-GTP-EF-1 α involvement. In that case EF-1 α stimulatory effect appears to occur at the stage of aminoacyl-tRNA dissociation from the synthetase as suggested by channeling hypothesis. Interestingly, ValRS separated from EF-1H cannot be activated by EF-1 α demonstrating the absolute requirement of the structure of whole valyl-tRNA synthetase-EF-1H complex for the stimulation. On the contrary, activation of PheRS can be induced by GDP form of EF-1 α as well. Moreover, the stimulatory effect was observed already at the level of phenylalanine activation, suggesting factor-synthetase interaction to occur at some step before aminoacyl-tRNA dissociation. A special functional role was suggested for EF-1 α -GDP complex, namely, to form EF-1 α *GDP*tRNA complex and to deliver deacylated tRNA to aminoacyl-tRNA synthetase.

The ability of EF-1 α -GDP to form a complex with tRNA was proved by several independent techniques. Analysis of EF-1 α -GDP endogenous fluorescence showed possible conformational change of the protein in the presence of tRNA^{Phe}. On the other side, partial RNase hydrolysis and chemical modification studies indicated conformational changes of tRNA^{Phe} and tRNA^{Leu} in the presence of EF-1 α -GDP. Interestingly, the sites of tRNA interaction with EF-1 α -GDP coincided well with known aminoacyl-tRNA sites of interaction with bacterial factor EF-Tu-GTP suggesting similarity of both complexes. Finally, the formation of quaternary complex EF-1 α -GDP-tRNA^{Phe}-PheRS was demonstrated by “band shift” technique. Thus, the principal possibility of two ways to transport tRNA between aminoacyl-tRNA synthetase and EF-1 α was demonstrated. Deacylated tRNA can be delivered from EF-1 α -GDP to synthetase (as in the case of PheRS), and aminoacyl-tRNA can be delivered from synthetase to EF-1 α -GTP (as in the case of ValRS). On the basis of these findings a model of translation apparatus functioning is developed which suggests EF-1 α to be a shuttle between ribosome and hypotetic macromolecular complex of synthetases and EF-1H.

The concept of functional compartmentalization of mammalian translation apparatus is put forward. Functional compartmentalization is the formation of labile protein-protein and protein-RNA complexes which provide organization of the translation compartments and their efficient functioning. The definition for translational compartment is as follows: it is an assembly of macromolecular complexes which are dynamically converted during mRNA translation in some limited space.

Негруцкий Б.С. Функциональная компартиментализация аппарата трансляции у высших эукариот. – Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.03 молекулярная биология. ИМБиГ НАН Украины, Киев, 1999 г.

Показана структурная и функциональная компартиментализация аминоксил-тРНК в клетках млекопитающих, обеспечивающая функционирование механизма ченелинга тРНК при трансляции. Обнаружена зависимость внутриклеточной локализации фактора элонгации EF-1 α , но не EF-1 δ , от фосфокреатина – основного компонента АТФ-регенерирующей системы. Продемонстрировано функциональное взаимодействие EF-1 α -GDP с фенилаланил-тРНК синтетазой, и EF-1 α -GTP – с валил-тРНК синтетазой, находящейся в комплексе с EF-1H. Выдвинуто предположение о разнонаправленном действии этих форм EF-1 α : EF-1 α -GDP доставляет деацилированную тРНК к аминоксил-тРНК синтетазе, а EF-1 α -GTP доставляет аминоксил-тРНК от синтетазы к рибосоме. Показано формирование комплекса EF-1 α -GDP-тРНК^{Phe}-фенилаланил-тРНК синтетаза. На основании полученных данных разработана концепция функциональной компартиментализации аппарата трансляции млекопитающих, выдвинуто положение о трансляционном компарimente.

Ключевые слова: эукариотический биосинтез белка, ченелинг, компартиментализация, аминоксил-тРНК синтетаза, фактор элонгации 1 α .

Негруцький Б.С. Функціональна компартменталізація апарату трансляції у вищих еукаріот.

– Рукопис. Дисертація на здобуття вченого ступеню доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.03 молекулярна біологія. ІМБіГ НАН України, Київ, 1999 р.

Показано структурну та функціональну компартменталізацію аміноацил-тРНК в клітинах ссавців, що забезпечує функціонування механізму ченелінга тРНК під час трансляції. Знайдено залежність внутришньоклітинної локалізації фактора елонгації EF-1 α , але не EF-1 δ , від фосфокреатину – основного компонента АТР-регенеруючої системи. Продемонстровано функціональну взаємодію EF-1 α -GDP з фенілаланіл-тРНК синтетазою, та EF-1 α -GTP – з валіл-тРНК синтетазою, що знаходиться в комплексі з EF-1H. Висунуто припущення про протилежноспрямовану дію цих форм EF-1 α : EF-1 α -GDP доставляє деацильовану тРНК до аміноацил-тРНК синтетази, а EF-1 α -GTP доставляє аміноацил-тРНК від синтетази до рибосоми. Показано формування комплексу EF-1 α -GDP-тРНК^{Phe}-фенілаланіл-тРНК синтетаза. Базуючись на отриманих даних, розроблено концепцію функціональної компартменталізації апарату трансляції ссавців, висунуто положення про трансляційний компартмент.

Ключові слова: еукаріотичний біосинтез білка, ченелінг, компартменталізація, аміноацил-тРНК синтетази, фактор елонгації 1 α .