

Відновлення активності аміноацил-тРНК синтетаз вищих еукаріотів та їхня стабілізація у присутності рибосом

Т. О. Лукаш, Г. В. Турківська, Г. В. Єльська

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

Роботу присвячено дослідженню функціональної взаємодії рибосом та аміноацил-тРНК синтетази (АРС) печінки кролів. Показано, що рибосоми здатні стимулювати активність лейцил-, ізолейцил- і фенілаланіл-тРНК синтетаз. Проаналізовано можливі механізми такого впливу. Зроблено висновок стосовно того, що рибосоми мають шапероноподібні властивості і таким чином можуть підтримувати активну конформацію АРС.

Вступ. Білок-синтезуючий апарат вищих еукаріотів відрізняється високим рівнем організації. Будова та функція особливих білок-синтезуючих компартментів у клітинах ссавців досліджується і обговорюється в багатьох роботах [1, 2]. Компартменталізація трансляційного апарату відбувається завдяки різноманітним білково-білковим та РНК-білковим взаємодіям.

Так, показано, що більша частина, якщо не всі аміноацил-тРНК синтетази (АРС), а також фактори ініціації і елонгації, є асоційованими чи співлокалізованими з полірибосомами, до того ж багато АРС формують високомолекулярні комплекси [3—9].

Існують численні свідчення щодо переваг надмолекулярної організації білок-синтезуючого апарату вищих еукаріотів [1, 2, 10, 11], однак функціональне значення неканонічної взаємодії окремих його складових, зокрема, АРС та рибосом лишається недостатньо з'ясованим, хоча є окремі відомості про вплив рибосом на активність деяких ферментів [12—14] і АРС [15, 16].

Статтю присвячено дослідженню впливу рибосом вищих еукаріотів на активність гомологічних АРС. Проаналізовано можливі механізми такого впливу. Показано, що рибосоми мають властивості, подібні до молекулярних шаперонів, тобто здатні

відновлювати активність частково денатурованих АРС та запобігати їхній денатурації.

Матеріали і методи. У роботі використано АТФ фірми «Boehringer Mannheim» (ФРН); GDP, GTP від «Sigma» (США); фосфоцелюлозу P-11, ДЕАЕ-целюлозу, фільтри GF/C від фірми «Whatman» (Велика Британія); сефакрил S-400, сефадекс G-200 від «Pharmacia» (Швеція); [¹⁴C] амінокислоти від «UVVVR» (Чехія).

тРНК з печінки кролів одержували з використанням методу фенольної депротейнізації та хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі.

Одержання 80S рибосом і рибосомних частинок та визначення функціональної активності рибосом у реакції зв'язування [¹⁴C]AcPhe-tRNA^{Phe} детально описано в роботі [17].

Високомолекулярні комплекси аміноацил-тРНК синтетаз (ВМК) одержували з печінки кролів із застосуванням м'якої гомогенізації та хроматографії пострібосомного супернатанту на сефадексі G-200. Активність лейцил-тРНК синтетаз (LeuRS) у реакції аміноацилювання тРНК визначали при насичувальних концентраціях субстратів у 100 мкл інкубаційної суміші, яка містила 100 мМ трис-НСl (рН 7,8), 15 мМ КCl, 7 мМ MgCl₂, 10 мМ АТФ, 0,09 мМ [¹⁴C]лейцин, 0,015—0,020 A₂₈₀ одиниць білка високомолекулярного комплексу, 80 мкг сумарної тРНК. Стандартну суміш інкубували протягом 3 хв при температурі 37 °С. Для визначення

Вплив 80S рибосом та рибосомних субчастинок на кінетичні параметри синтезу Leu-тРНК

Ефектор	V_{\max} , пмоль/хв	K_M , мкМ	V_{\max}/K_M
Без рибосом	$3,4 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,06$	$17,0 \pm 0,08$
80S рибосоми	$7,8 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,07$	$33,3 \pm 0,12$
60S рибосоми	$7,2 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,05$	$31,3 \pm 0,07$
40S рибосоми	$5,9 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,06$	$23,6 \pm 0,08$

кінетичних констант реакції аміноацилювання тРНК досліджували залежність швидкості реакції від концентрації тРНК, яку варіювали від 0 до 120 мкг. Активність ізолейцил-тРНК синтетази (PheRS) у складі ВМК визначали в 100 мкл інкубаційної суміші, яка містила 100 мМ трис-НСІ (рН 7,8), 20 мМ КСІ, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ АТР, 0,08 мМ [¹⁴C]ізолейцин, 0,015—0,020 A₂₈₀ одиниць білка високомолекулярного комплексу, 80 мкг сумарної тРНК. Суміш інкубували протягом 3 хв при температурі 37 °С.

Фенілаланін-тРНК синтетазу (PheRS) одержували за методикою [18] з деякими модифікаціями. Початкові швидкості реакції аміноацилювання тРНК досліджували при насичувальних концентраціях субстратів у 100 мкл інкубаційної суміші, яка містила 20 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 100 мМ КСІ, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ АТР, 0,06 мМ [¹⁴C]фенілаланін, 150 мкг сумарної тРНК та 6,5 нМ PheRS. Суміш інкубували протягом 3 хв при 25 °С.

Результати і обговорення. Як зазначалося вище, частина АРС у клітинах ссавців існує в складі високомолекулярного комплексу. Видавалося доцільним детально дослідити вплив рибосом на активність АРС, що входять до складу ВМК, зокрема LeuRS та PheRS. 80S рибосоми або 40S та 60S субчастинки вносили безпосередньо до інкубаційної суміші для аміноацилювання тРНК. У таблиці наведено результати вивчення впливу рибосом на кінетичні параметри реакції аміноацилювання тРНК, що каталізується LeuRS.

При додаванні рибосом спостерігається збільшення співвідношення V_{\max}/K_M , яке є важливим критерієм ефективності реакції аміноацилювання. З наведених даних видно, що як цілі рибосоми, так і їхні окремі субчастинки здатні впливати на активність LeuRS, хоча сила їхнього впливу трохи різниться. Найменш виражений ефект спостерігали у присутності 40S субчастинок.

Визначено концентрації рибосом, за яких вони максимально впливали на активність LeuRS. Показано, що найвищий рівень стимуляції LeuRS (0,020 A₂₈₀ одиниць білка високомолекулярного комплексу) в реакції аміноацилювання спостерігається у

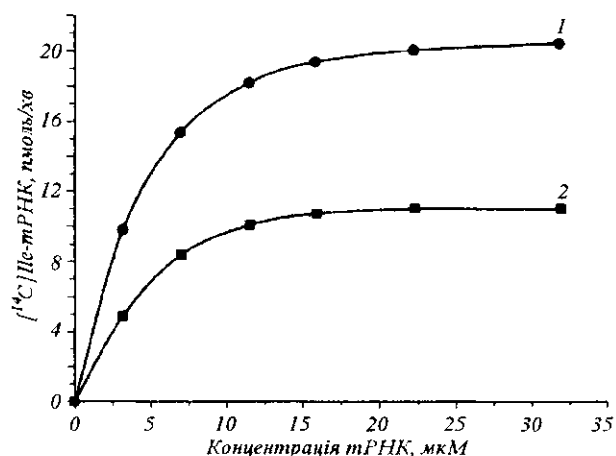


Рис. 1. Залежність швидкості синтезу [¹⁴C]Phe-тРНК від концентрації тРНК у присутності 80S рибосом (1) та без рибосом (2)

присутності 0,7—0,75 мкМ концентрації рибосом або субчастинок у пробі.

Зареєстровано аналогічний вплив рибосом на активність PheRS у складі ВМК (рис. 1).

Для перевірки специфічності стимулювальної дії рибосом здійснено цілу низку контрольних експериментів. Замість рибосом до інкубаційної суміші додавали рибосомні білки, рРНК або бичачий сироватковий альбумін (БСА) у концентраціях, рівних концентрації рибосом. Ніякої дії цих макромолекул на активність АРС не було виявлено.

Не виключено, що підвищення активності LeuRS у реакції аміноацилювання може бути обумовлено інактивацією деяких інгібіторів аміноацилювання рибосомами. Для перевірки цього припущення було вивчено можливий ефект рибосом на пригнічення реакції аміноацилювання неорганічним пірофосфатом — природним інгібітором, що є продуктом цієї реакції. Пригнічення реакції аміноацилювання спостерігалось в однаковій мірі як у присутності, так і за відсутності рибосом, тобто рибосоми не здатні запобігати дії інгібітора (даних не представлено).

Постає питання, чи спостерігатиметься стимулювальний ефект рибосом, якщо швидкість реакції аміноацилювання знижено за рахунок неоптимальних умов її проведення? Ми дослідили утворення Leu-тРНК у присутності різних концентрацій іонів магнію та за різних співвідношень Mg²⁺/АТР.

Встановлено, що для максимальної швидкості реакції аміноацилювання необхідною є присутність у пробі 7 мМ MgCl₂ та 10 мМ АТР. Як видно з рис. 2, найвищий рівень стимуляції спостерігався при нижчих порівняно з оптимумом концентраціях Mg²⁺ (1—4 мМ), у той час як за оптимальних умов

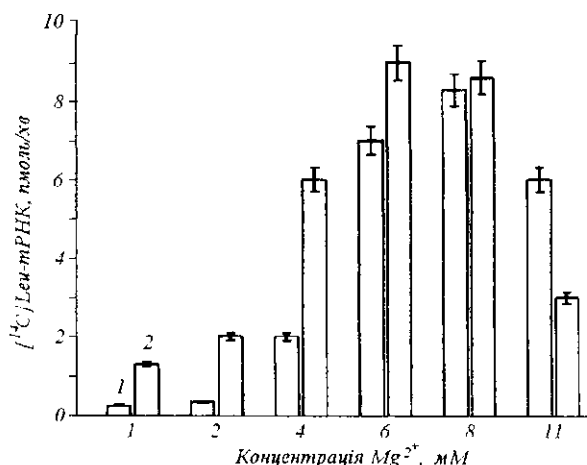


Рис. 2. Вплив різних концентрацій Mg²⁺ на здатність 80S рибосом стимулювати активність LeuRS у реакції аміноацилювання тРНК у присутності 10 мМ АТФ: 1 — активність LeuRS без додавання рибосом; 2 — активність LeuRS у присутності 0,75 мкМ концентрації рибосом

проведення реакції рівень стимуляції був значно меншим. При більших за оптимум концентраціях Mg²⁺ рівень аміноацилювання тРНК був так само меншим, як і за нижчих концентрацій Mg²⁺, однак стимуляції аміноацилювання рибосомами при цьому не відмічалось. Відомо, що для підтримання функціональної активності рибосом необхідна відносно низька концентрація іонів магнію (3—5 мМ), подальше ж зростання їхньої концентрації призводить до значної зміни конформації рибосом. Цілком вірогідно, що зміна конформації рибосом при підвищеній концентрації Mg²⁺ зумовлює їхню нездатність до продуктивної взаємодії з АРС.

Раніше нами показано, що очищені рибосоми вищих еукаріотів мають АТРазну активність [17, 19], яка може впливати на конформаційний стан самої рибосоми і, ймовірно, на її здатність стимулювати АРС. Для перевірки можливого зв'язку стимулювального впливу рибосом з функціонуванням рибосомної АТРази ми використали алкалоїд еметин, відомий як інгібітор рибосомної АТФ. Показано, що при концентрації еметину, при якій вдвічі зменшується АТРазна активність рибосом, але не змінюється активність АРСаз, рівень стимуляції рибосомами активності LeuRS також лишався незмінним (рис. 3). При подальшому підвищенні концентрації еметину спостерігався його помітний негативний вплив на реакцію аміноацилювання, при цьому величина стимулювального ефекту рибосом зростала. Таке підвищення стимулювальної дії рибосом важко пояснити, оскільки механізм впливу еметину на реакцію аміноацилювання тРНК невідомий. Однак можна стверджувати, що

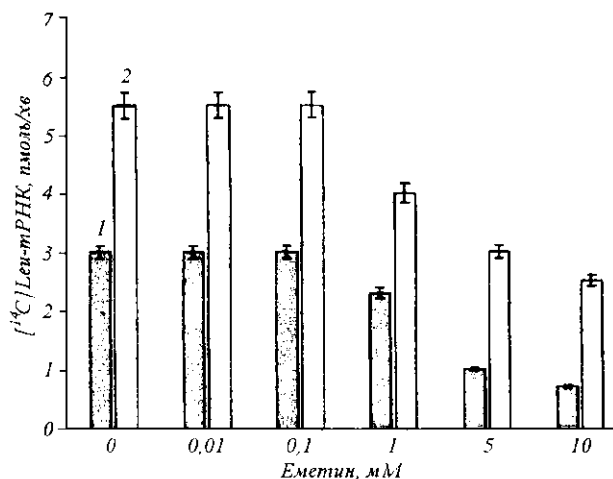


Рис. 3. Вплив різних концентрацій еметину на здатність рибосом стимулювати активність LeuRS: 1 — активність LeuRS без додавання рибосом; 2 — активність LeuRS у присутності 0,75 мкМ концентрації рибосом

стимулювальний вплив рибосом на активність LeuRS, скоріш за все, не пов'язаний з АТРазною активністю рибосоми.

Максимальний рівень стимуляції звичайно спостерігався при роботі з LeuRS, яка частково денатурувала при тривалому зберіганні. При використанні комплексу АРС відразу після очистки, тобто за умов, які забезпечують його нативну структуру, стимуляція активності LeuRS була незначною. Можна припустити, що підвищення активності частково денатурованого ферменту у присутності рибосом є результатом відновлення його активної конформації, тобто підвищення активності ферменту слугує індикатором зумовленого присутністю рибосом відновлення нативної конформації АРС. Відомо, що прокаріотні 70S рибосоми здатні здійснювати рефолдинг частково денатурованих глюкозо-6-дегідрогенази, лактатдегідрогенази [12, 14,] та роданази [13].

Показано, що, крім 70S рибосоми, її велика 50S субчастинка і 23S рРНК можуть відновлювати активність частково денатурованих ферментів, у той час як 30S субчастинка подібних властивостей не виявляє. На підставі отриманих результатів автори припустили можливість виконання рибосомами функцій, подібних до молекулярних шаперонів — класу поліпептид-зв'язувальних білків, які беруть участь у білковому фолдингу та забезпечують ренатурацію білків, зокрема, їхнє складання в олігомерну структуру, захищають їх від денатурації. У згаданих вище роботах показано, що на відміну від багатьох молекулярних шаперонів, що потребують АТФ для рефолдингу денатурованих

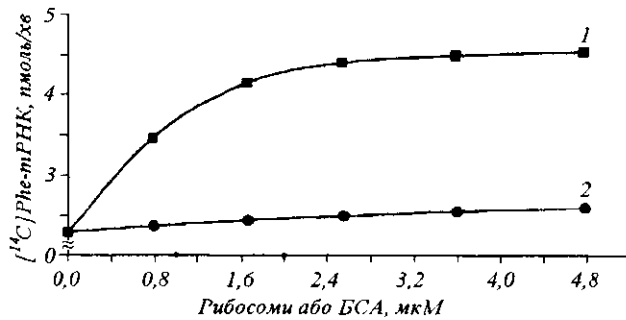


Рис. 4. Реактивация PheRS. Частково денатуровану PheRS (26 нМ) прогрівали протягом 3 хв при температурі 25 °С у присутності різних концентрацій 80S (1) рибосом і БСА (2). Після прогрівання активність PheRS визначали в реакції аміноацилювання, де кінцеві концентрації PheRS та рибосом складала 7,5 нМ та 0—1,2 мкМ відповідно

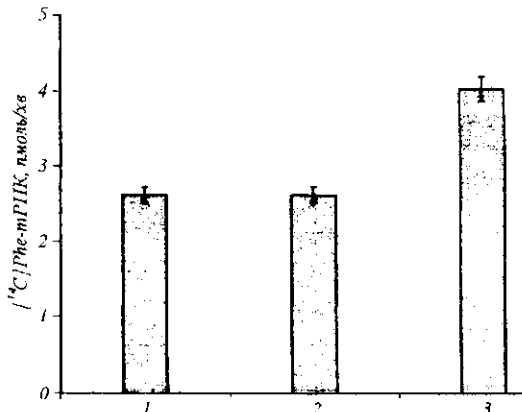


Рис. 5. Стабілізація PheRS у присутності рибосом і БСА. PheRS (5,2 мкМ) розводили в 200 разів буфером, який містить 10 мМ трис-НСІ, рН 7,6, 10 мМ 2-меркаптостанол (1), або цим же буфером з додаванням 3 мкМ БСА (2) чи 3 мкМ рибосом (3). Після розведення проби прогрівали при температурі 42 °С протягом 10 хв. Залишкову активність PheRS визначали в реакції аміноацилювання тРНК. Кінцеві концентрації БСА (2) та рибосом (3) у пробі для аміноацилювання складала 0,75 мкМ

білків, рефолдинг у присутності рибосом відбувався без гідролізу АТФ. На жаль, при визначенні активності АРС у реакції аміноацилювання АТФ є одним із субстратів цієї реакції, що виключало в наших експериментах можливість виявлення АТФ-залежності стимуляції активності АРС рибосомами.

Припущення щодо шапероноподібної ролі рибосом було перевірено при вивченні можливого впливу рибосом на каталітичну активність високоочищеної PheRS. У цих експериментах використовували високоочищений фермент як у нативній формі, так і попередньо денатурований розведенням у 200 разів та прогріванням при температурі 42 °С. Відомо, що АРС вищих еукаріотів, зокрема,

олігомерні PheRS ($\alpha\beta_2$), є надзвичайно лабільними. При розведенні до низьких концентрацій і прогріванні вони частково втрачають свою активність, що може бути результатом часткової інактивації ферменту через спровокований розведенням зсув рівноваги активний олігомер \rightarrow неактивні мономери, який спостерігався у випадку кількох АРС [15, 16]. Якщо активність PheRS досліджували безпосередньо після очистки ферменту та за умов, що забезпечують його нативну структуру, наприклад, при розведенні буфером, який містив 4 мг/мл БСА, то додавання рибосом ніяк не впливало на його активність. При розведенні ж ферменту (5,2 мкМ PheRS) у 200 разів буфером, який не містив БСА, та наступному прогрівання протягом 10 хв при 42 °С спостерігали зниження його активності на 50—70 %.

Додавання рибосом майже повністю відновлювало активність АРС (рис. 4). Таким чином, показано, що рибосоми здатні відновлювати активність частково денатурованої PheRS. Контрольний білок (БСА) у тій же концентрації не зумовлював реактивації денатурованого ферменту. Встановлено, що для максимального відновлення активності PheRS (7,5 нМ — концентрація в пробі для аміноацилювання) необхідна 0,75 мкМ концентрація 80S рибосом. Варте уваги те, що саме таке молярне співвідношення рибосом та АРС (приблизно 1:100) існує в цитоплазмі клітин вищих еукаріотів [5, 20].

У подальших експериментах показано здатність рибосом підтримувати продуктивну конформацію PheRS в умовах розведення. Повна активність ферменту зберігалася при додаванні рибосом до буфера для розведення ферменту, в той час як БСА за тих же концентрацій не виявляв подібного ефекту (рис. 5). Можливість стабілізації рибосомами активної конформації АРС добре узгоджується з нашими попередніми даними щодо здатності рибосом підвищувати термостабільність LeuRS [21].

Таким чином, якщо прийняти підвищення активності ферменту в реакції аміноацилювання після ренатурації у присутності рибосом за кількісну міру рефолдингу денатурованого ферменту в його нативну конформацію, то одержані в роботі результати дають підставу стверджувати, що рибосоми здатні підтримувати та відновлювати продуктивну конформацію АРС, тобто проявляють дію, подібну до молекулярних шаперонів. Виявлена функція рибосом може бути важливою для забезпечення активності білок-синтезуючого апарату трансляційних компартментів протягом послідовних циклів елонгації.

T. O. Lukash, G. V. Turkovskaya, A. V. El'skaya

Restoration of the activity of higher eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases and their stabilization in the presence of ribosomes

Summary

The present work concerns the functional interaction between the rabbit liver ribosomes and aminoacyl-tRNA synthetases. We have shown that the ribosomes are able to stimulate the activity of leucyl-, isoleucyl- and phenylalanyl-tRNA synthetases. Possible mechanisms of this effect have been analysed. It is concluded, that the ribosomes have chaperone-like property in the maintenance of the ARS active conformation.

T. A. Лукаш, Г. В. Турковская, А. В. Ельская

Восстановление активности аминоксил-тРНК синтетаз высших эукариотов и их стабилизация в присутствии рибосом

Резюме

Работа посвящена исследованию функционального взаимодействия рибосом и аминоксил-тРНК синтетаз (АРС) печени кроликов. Показано, что рибосомы способны стимулировать активность лейцил-, изолейцил- и фенилаланил-тРНК синтетаз. Проанализированы возможные механизмы такого влияния. Сделан вывод о том, что рибосомы имеют шапероноподобные свойства и могут таким образом поддерживать активную конформацию АРС.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Spirin A. S., Ovchinnikov L. P. Compartmentation of proteins of the translational machinery on eukaryotic polyribosomes // Progr. Bioorg. Chem. and Mol. Biol.— Amsterdam; New York: Elsevier, 1984.—P. 71—82.
2. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Functional compartmentalization of the translation apparatus and channeling of tRNA/aminoacyl-tRNA in cells of higher eukaryotes // Молекуляр. биология.—2001.—35.—С. 702—707.
3. Ussery M., Tanaka W., Hardesty B. Subcellular distribution of aminoacyl-tRNA synthetases in various eukaryotic cells // Eur. J. Biochem.—1977.—72.—P. 491—500.
4. Fedorov A. N., Alzhanova A. T., Ovchinnikov L. P. Association of eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases with polyribosomes // Биохимия.—1985.—50.—С. 1639—1645.
5. Ryazanov A. G., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S. Development of structural organization of protein-synthesizing machinery from prokaryotes to eukaryotes // Biosystems.—1987.—20.—P. 275—288.
6. Mirande M., Le Corre D., Louvard D., Reggio H., Pailliez J.-Ph., Waller J.-P. Association of an aminoacyl-tRNA synthetase complex and of phenylalanyl-tRNA synthetase with the cytoskeletal framework fraction from mammalian cells // Exp. Cell. Res.—1985.—156.—P. 91—102.
7. Deutscher M. P. The eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex: suggestions for its structure and function // J. Cell. Biol.—1984.—99.—P. 373—377.
8. Иванов Л. Л., Коваленко М. И., Турковская Г. В., Ельская

- А. В. Структурно-функциональные особенности эукариотических аминоксил-тРНК синтетаз // Биохимия.—1992.—57, № 8.—С. 1123—1141.
9. 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.
10. Negrutskii B. S., Deutscher M. P. A channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 4991—4995.
11. Stapulonis R., Deutscher M. P. A channeled tRNA cycle during mammalian protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92.—P. 7158—7161.
12. 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.
13. 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.
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. Carias J. R., Mouricout M., Quitard B., Thomes J.-C., Julien R. Leucyl-tRNA and arginyl-tRNA synthetases of germ. Inactivation and ribosome effect // Eur. J. Biochem.—1978.—87.—P. 583—590.
16. Jakubowski H. A role for protein-protein interactions in the maintenance of active forms of aminoacyl-tRNA synthetases // FEBS Lett.—1979.—103.—P. 71—76.
17. Rodnina M. V., Serebryanik A. I., Ovcharenko G. V., El'skaya A. V. ATPase strongly bound to higher eukaryotic ribosomes // Eur. J. Biochem.—1994.—225.—P. 305—310.
18. Pailliez 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.
19. El'skaya A. V., Ovcharenko G. V., Palchevskii S. S., Petrushenko Z. M., Triana-Alonso F. J., Nierhaus K. H. Three tRNA binding sites in rabbit liver ribosomes and role of the intrinsic ATPase in 80S ribosomes from higher eukaryotes // Biochemistry.—1997.—36.—P. 10492—10497.
20. Slobin L. I. The role of eukaryotic elongation factor Tu content in protein synthesis. The measurement of the elongation factor Tu content of rabbit reticulocytes and other mammalian cells by a sensitive radioimmunoassay // Eur. J. Biochem.—1980.—110.—P. 555—563.
21. Сана Сара, Іванов Л. Л., Турковская Г. В., Мартинкус Э. П., Коваленко М. И., Ельская А. В. Влияние рибосом на термостабільність аминоксил-тРНК синтетаз // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.—P. 6—9.

УДК 577.152.611 577.217.535
Надійшла до редакції 18.03.04