

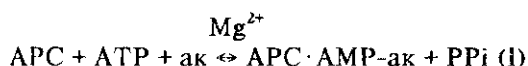
Влияние 80S рибосом на активность лейцил-тРНК синтетазы высших эукариот на первом этапе аминоацилирования тРНК

Л. Л. Белянская, Г. В. Турковская, М. И. Коваленко, А. В. Ельская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

80S рибосомы стимулируют первую стадию реакции аминоацилирования — стадию образования аминоациладенилат-ферментного комплекса. Обсуждается возможное функциональное значение взаимодействия аминоацил-тРНК синтетаз и рибосом в клетках высших эукариот.

Введение. Классическая схема реакции, катализируемой аминоацил-тРНК синтетазами (АРС, КФ 6.1.1), включает промежуточное образование прочно связанного с ферментом аминоациладенилата (I этап) и последующий перенос аминокислоты (ак) на тРНК (II этап) с образованием соответствующей аминоацил-тРНК (aa-тРНК) [1].



Хотя АРС прокариот, дрожжей и высших эукариот выполняют одинаковую функцию, осуществляя высокоспецифическое аминоацилирование тРНК, они отличаются по ряду свойств. Для АРС высших эукариот характерны более высокие значения молекулярных масс по сравнению с прокариотическими аналогами, выраженные гидрофобные свойства, высокое сродство к рРНК, функционирование в составе высокомолекулярных комплексов (ВМК), ассоциация с рибосомами и системой клеточных мембран [2—4]. Эти свойства АРС вносят вклад в компартиментализацию процесса биосинтеза белка, являющуюся характерным свойством эукариотической клетки [5].

Одним из проявлений компартиментализации могут быть так называемые неканонические взаи-

модействия отдельных компонентов аппарата трансляции. В этом плане значительный интерес представляет возможное взаимодействие АРС и рибосом.

В предыдущих исследованиях было показано, что высокоочищенные 80S рибосомы печени кроликов в 2—3 раза повышают каталитическую активность гомологичной лейцил-тРНК синтетазы в суммарной реакции аминоацилирования тРНК, при этом величина коэффициента Хилла увеличивалась от 1,2 до 1,8. Кроме того, в присутствии рибосом возрастала термостабильность исследуемого фермента [6, 7].

В представленной работе продемонстрирована стимуляция 80S рибосомами реакции АТР-[³²P]пирофосфатного обмена, катализируемой лейцил-тРНК синтетазой в составе ВМК. Эти данные свидетельствуют о том, что стимулирующее действие рибосом проявляется уже на первой стадии реакции аминоацилирования — стадии образования аминоациладенилат-ферментного комплекса.

Материалы и методы. ВМК АРС получали из печени кролей с использованием мягкой, щадящей гомогенизации в гомогенизаторе Поттера и последующей гель-фильтрации пострибосомного супернатанта на сефадексе G-200 [6, 7].

Получение 80S рибосом и их субчастиц из печени описано в [8]. В основу методики положена схема, включающая препаративное выделение полисом, преинкубацию последних в условиях, необ-

ходимых для трансляции эндогенных мРНК с последующим добавлением пуромицина, диссоциацию рибосом на субчастицы и отделение субчастиц от остальных компонентов системы трансляции центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы в зональном роторе Ti-14 центрифуги «Вескман» L-5 (США).

Диссоциацию рибосом на субчастицы и очистку проводили в буфере, содержащем 0,6 М КСl. Гомогенность препаратов рибосомных субчастиц определяли аналитическим ультрацентрифугированием. 80S рибосомы получали реассоциацией 40S и 60S субчастиц. 90 % полученных 80S рибосом были активны в реакции связывания AcPhe-тРНК^{Phe} в присутствии поли (U).

Определение ферментативной активности лейцил-тРНК синтетазы в составе ВМК АРС в реакции АТР-[³²P]пирофосфатного обмена. При постановке реакции АТР-[³²P]пирофосфатного обмена за основу были взяты методики из работ [9, 10] с некоторыми модификациями. Вследствие обратимости реакции активации аминокислот в присутствии аминокислоты, специфичной для данной АРС, при добавлении [³²P]пирофосфата равновесие реакции сдвигается в сторону образования меченой АТР. Скорость реакции измеряют по нарастанию количества [³²P]АТР.

Инкубационная смесь в объеме 100 мкл содержала 100 мМ трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ MgCl₂, 10 мМ АТР, 1 мМ лейцин, 0,045 ед. А₂₈₀ ВМК АРС, 10 мМ NaF, 3 мМ [³²P]пирофосфат натрия (37 ПБк/моль, Обнинск, Россия), 20 мкг БСА, 0—1,4 мМ 80S рибосом. Инкубацию проводили в течение 4 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,2 М пирофосфата натрия в 5 %-м растворе трихлоруксусной кислоты. Затем в пробы вносили 1 мл 0,2 М водной суспензии активированного угля норит А (50 мг/мл) и оставляли на 30 мин при 0 °С. Смесь сорбировали на фильтрах GF/C фирмы «Whatman» (Англия), промывали 60 мл дистиллированной воды и закрепляли на фильтрах, пропуская 2 мл 10 %-го раствора поливинилового спирта в воде. После высушивания фильтров определяли их радиоактивность на сцинтилляционном счетчике SL-30 («Intertechnique», Франция).

Следует подчеркнуть, что во всех экспериментах по изучению АТР-[³²P]пирофосфатного обмена была исследована и учтена неспецифическая сорбция [³²P] на фильтрах.

Результаты и обсуждение. Одним из подходов для изучения I этапа реакции аминокислирования является определение АТР-[³²P]пирофосфатного обмена.

Для изучения влияния эукариотических рибосом на активность лейцил-тРНК синтетазы в условиях, приближенных к условиям *in vivo*, использовали ВМК АРС, полученные после гель-фильтрации пострибосомного супернатанта на сефадексе G-200.

Поскольку в работе использованы препараты ВМК АРС, для подавления эндогенной пирофосфатной активности при постановке реакции АТР-[³²P]пирофосфатного обмена применяли 10 мМ NaF [11]. Об активности лейцил-тРНК синтетазы в АТР-[³²P]пирофосфатном обмене как в присутствии, так и в отсутствие 80S рибосом, судили по начальной скорости реакции при насыщающих концентрациях АТР и аминокислоты.

Интересно отметить, что линейная зависимость образования [³²P]АТР от времени инкубации наблюдается на протяжении по крайней мере 60 мин (рис. 1). Такая кинетика обнаружена как в присутствии, так и в отсутствие рибосом. Как видно из этого рисунка, начальная скорость реакции выше при наличии рибосом в 1,6 раза.

Поскольку мы были ограничены наличием [³²P]пирофосфата натрия, и в экспериментах, представленных на рис. 1, 3, 4, его концентрация составляла 3 мМ, важно было проверить, наблюдается ли стимуляция рибосомами начальной скорости реакции АТР-[³²P]пирофосфатного обмена при различных концентрациях [³²P]пирофосфата натрия. Как видно из рис. 2, при всех использованных концентрациях пирофосфата как ниже, так и выше 3 мМ наблюдается стимуляция рибосомами начальной скорости образования [³²P]АТР.

Так как на этапе образования аминокислиладезилата важную роль играет комплекс Mg·АТР и, кроме того, в предыдущих исследованиях была замечена четко выраженная зависимость стимуляции рибосомами лейцил-тРНК синтетазы от концентрации магния в суммарной реакции аминокислирования, была исследована такая зависимость и в реакции АТР-[³²P]пирофосфатного обмена. Как видно из рис. 3, стимуляция рибосомами АТР-[³²P]пирофосфатного обмена отмечена при всех исследуемых концентрациях магния.

На рис. 4 представлена зависимость образования [³²P]АТР от концентрации рибосом. Из этого рисунка следует, что добавление возрастающего количества рибосом к стандартной инкубационной смеси приводит к увеличению начальной скорости реакции образования [³²P]АТР.

Высокая эффективность белкового синтеза в достаточно большом объеме цитоплазмы эукариотической клетки может быть обеспечена за счет компарментализации белоксинтезирующего аппара-

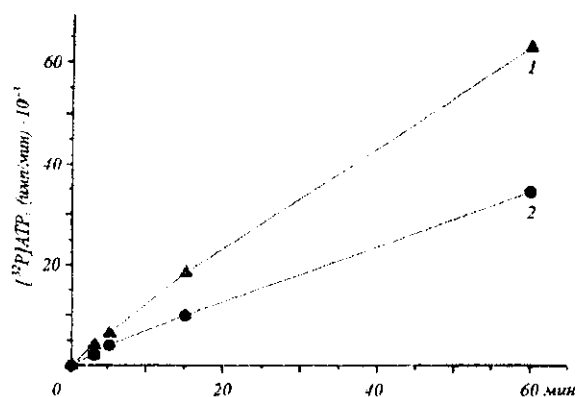


Рис. 1. Зависимость активности лейцил-тРНК синтетазы в реакции АТР-[³²Р]пирофосфатного обмена от времени инкубации в присутствии (1) и в отсутствие рибосом (2)

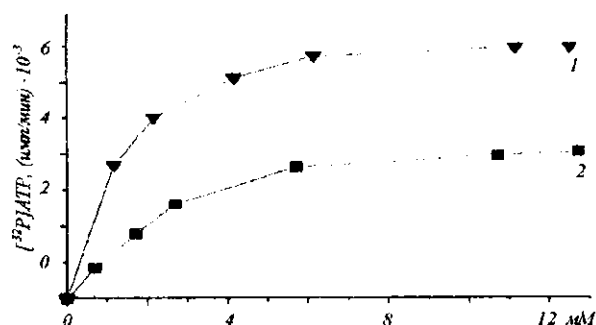


Рис. 2. Зависимость активности лейцил-тРНК синтетазы от концентрации ионов Mg²⁺ в реакции АТР-[³²Р]пирофосфатного обмена в присутствии (1) и в отсутствие рибосом (2)

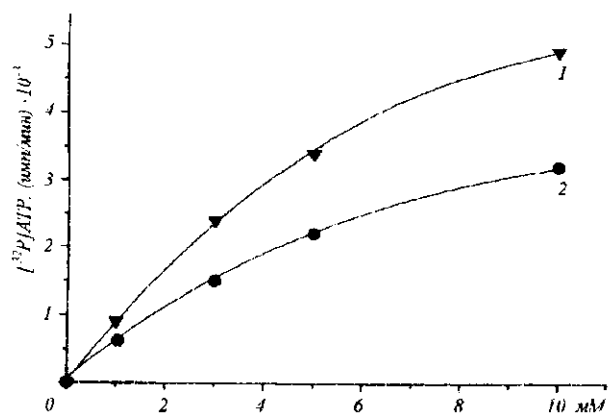


Рис. 3. Зависимость активности лейцил-тРНК синтетазы от концентрации пирофосфата натрия в реакции АТР-[³²Р]пирофосфатного обмена в присутствии (1) и в отсутствие рибосом (2)

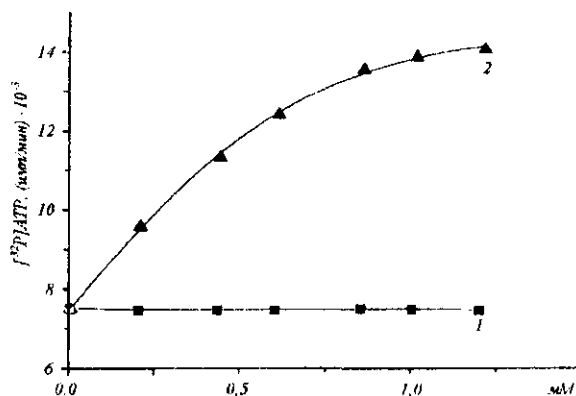


Рис. 4. Зависимость активности лейцил-тРНК синтетазы от концентрации рибосом в реакции АТР-[³²Р]пирофосфатного обмена в присутствии (1) и в отсутствие рибосом (2)

та, когда все необходимые для трансляции компоненты сконцентрированы в одном месте. Это может быть как перманентная ассоциация в мультимолекулярные комплексы, например, ВМК АРС, так и образование временных промежуточных комплексов, в частности, в случае предполагаемого взаимо-

действия факторов элонгации и АРС, а также при ассоциации АРС с рибосомами.

В предыдущих исследованиях показана стимуляция 80S рибосомами печени кроликов каталитической активности гомологичной лейцил-тРНК синтетазы в составе ВМК в суммарной реакции

аминоацилирования тРНК [6, 7]. В данной работе продемонстрировано стимулирующее влияние 80S рибосом на лейцин-зависимый АТФ- $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатный обмен, катализируемый тем же ферментом, что свидетельствует о стимуляции рибосомами образования лейциладенилата. Эти данные дают возможность уточнить механизм стимулирующего действия рибосом в суммарной реакции аминоацилирования тРНК.

Можно предложить два объяснения обнаруженного факта. Первое основано на том, что стимуляция лейцил-тРНК синтетазы рибосомами является «видимой» и, возможно, обусловлена стабилизацией конечного продукта реакции аминоацилирования — аминоацил-тРНК. Второе объяснение заключается в том, что лимитирующей скоростью стадией реакции аминоацилирования может быть диссоциация лейцил-тРНК из лейцил-тРНК синтетазы, как в случае аспартил-тРНК синтетазы [11, 12]. Однако полученные результаты по стимуляции рибосомами уже первой стадии реакции аминоацилирования позволяют исключить предложенные выше механизмы. Наиболее вероятной причиной стимулирующего влияния рибосом может быть непосредственное взаимодействие лейцил-тРНК синтетазы с рибосомой, в результате которого происходят конформационные перестройки фермента, приводящие к его активации.

Структурно-функциональное взаимодействие отдельных компонентов аппарата трансляции клеток высших эукариот, в том числе АРС и рибосом, их компартментализация обеспечивают возможность поддержания оптимального уровня их функционирования, а также возможность регуляции функционирования этого аппарата как единого целого.

Л. Л. Белянская, Г. В. Турковская, М. И. Коваленко,
Г. В. Ельска

Вплив 80S рибосом на активність лейцил-тРНК синтетаз
вищих еукаріот на першому етапі аміноацилювання тРНК

Резюме

80S рибосоми стимулюють першу стадію реакції аміноацилювання — стадію утворення аміноацїладенїлат-ферментного комплексу. Обговорюється можливе функціональне значення взаємодії аміноацїл-тРНК синтетаз та рибосом у клітинах вищих еукаріот.

L. L. Belyanskaya, H. V. Turkovskaya, M. I. Kovalenko,
A. V. El'skaya

Effect of 80S ribosomes on higher eukaryotic leucyl-tRNA synthetase activity at the first stage of tRNA aminoacylation

Summary

80S ribosomes stimulate activity of homologous leucyl-tRNA synthetase on the first stage of tRNA aminoacylation, namely for formation enzyme bound aminoacyl-adenylate. A possible mechanism and functional significance of the interaction between eukaryotic leucyl-tRNA synthetase and ribosomes are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик И. О. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.—М.: Наука, 1984.—408 с.
2. Иванов Л. Л., Коваленко М. И., Турковская Г. В., Ельска А. В. Структурно-функциональные особенности эукариотических аминоацил-тРНК синтетаз // Биохимия.—1992.—57, № 8.—С. 1123—1141.
3. 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—142.
4. Kisselev L. L., Wolfson A. D. Aminoacyl-tRNA synthetases from higher eukaryotes // Ibid.—1994.—48.—P. 86—142.
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. Сана Сара, Мозурайтис Р. Ю., Харченко О. В. и др. Взаимодействие эукариотических аминоацил-тРНК синтетаз с рибосомами // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 1.—С. 101—107.
7. Сана Сара, Иванов Л. Л., Турковская Г. В. и др. Влияние рибосом на термостабильность аминоацил-тРНК синтетаз печени кроликов // Там же.—№ 3.—С. 6—9.
8. Потапов А. П., Овчаренко Г. В., Солдаткин К. А. Получение и характеристика 40S и 60S субчастиц рибосом из печени кролика // Методы молекуляр. биологии.—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 100—105.
9. Lemoine F., Waller J.-P., van Rapenbusch R. Studies on methionyl transfer RNA synthetase 1. Purification and some properties of methionyl transfer RNA synthetase from *E. coli* K-12 // Eur. J. Biochem.—1968.—4.—P. 213—221.
10. Овчаренко Г. В., Иванов Л. Л. Методы определения ферментативной активности аминоацил-тРНК синтетаз // Методы молекуляр. биологии.—Киев: Наук. думка, 1979.—С. 133—140.
11. Kikuo Ogata, Ayumi Kurahashi, Naoya Kenmochi, Kazuo Terao. Role of 5S rRNA as a positive effector of some aminoacyl-tRNA synthetases in macromolecular complex, with specific reference to methionyl-tRNA synthetase // J. Biochem.—1991.—110.—P. 1037—1044.
12. Reed V. S., Wastney M. E., Yang D. C. H. Mechanisms of the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 α // J. Biol. Chem.—1994.—269.—P. 32932—32936.

Поступила в редакцию 25.03.97