

Ренатурація фенілаланіл-тРНК синтетази фактором елонгації eEF1A

Т. О. Лукаш, Г. В. Турківська, Б. С. Негруцький, Г. В. Єльська

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

Фактор елонгації трансляції eEF1A забезпечує зв'язування кодонспецифічної аміноацил-тРНК з аміноацильним сайтом рибосоми. В даній роботі показано, що, крім своєї ролі в трансляції, eEF1A має властивості, подібні до шаперонів, і здатний відновлювати активність денатурованої фенілаланіл-тРНК синтетази (PheRS). eEF1A·GDP і eEF1A·GTP форми фактора показують однаковий рівень активності у стимуляції ренатурації ферменту. Здатність eEF1A стимулювати ренатурацію денатурованої PheRS може бути важливою для підтримки активної конформації ферменту в клітинах.

Вступ. Еукаріотний фактор елонгації трансляції eEF1A, подібно до EF1A (EF-Tu) прокаріотів, забезпечує транспорт та зв'язування відповідних кодонспецифічних аміноацил-тРНК до А-сайта рибосоми, формуючи при цьому третинний комплекс з GTP та аміноацил-тРНК. Для фактора елонгації характерним є значно вищий відносний вміст у клітинах в порівнянні з іншими білковими компонентами апарату трансляції. Така чисельність фактора стимулює пошук додаткових його функцій. Результати досліджень останніх років свідчать про те, що фактори елонгації трансляції, особливо еукаріотний eEF1A, виконують інші функції, крім загальновідомої участі в біосинтезі білка. Наприклад, eEF1A бере участь в організації та реорганізації цитоскелету та в залежній від убіквітину протеолітичній системі. До того ж, є свідчення щодо можливої ролі eEF1A в транскрипції мРНК, транспорті нової тРНК з ядра в цитоплазму [1]. Для прокаріотного EF1A показано здатність діяти як молекулярні шаперони, що залучені до білкового фолдингу та білкової ренатурації. Так, EF1A сприяє ренатурації цитратсинтази, α -глюкозидази після їхньої денатурації сечовиною [2] та здатний лідсилувати рефолдинг денатурованої рондази [3]. Більш того, є дані, що три поліпептиди теплового шоку, які можуть бути причетні до

розвитку термотолерантності кукурудзи, мають амінокислотну послідовність, подібну до такої фактора елонгації EF1A бактерій та хлоропластів [4]. Нещодавно показано, що еукаріотний фактор елонгації 1A здатний взаємодіяти з наново синтезованими поліпептидами, а також стимулювати рефолдинг денатурованої люциферази [5], тобто теж має властивості, подібні до шаперонів.

У цій роботі показано, що eEF1A вищих еукаріотів відновлює активність денатурованої фенілаланіл-тРНК синтетази (PheRS). Можливість взаємодії eEF1A та PheRS було продемонстровано в попередніх дослідженнях за допомогою методу плазмонного резонансу на поверхні [6]. Отримані нами дані свідчать про те, що, крім своєї ролі в трансляції, eEF1A може бути причетним до формування активної конформації PheRS, а також сприяти її підтримці в клітинах вищих еукаріотів.

Матеріали і методи. В роботі використано АТР фірми «Boehringer Mannheim» (ФРГ), GDP, GTP від «Sigma» (США), фосфоцелюлозу P-11, ДЕАЕ-целюлозу, фільтри GF/C від фірми «Whatman» (Велика Британія), сефакрил S-400 від «Pharmacia» (Швеція), дитіотреїтол (ДТТ) від «Serva» (ФРГ), [^{14}C]фенілаланін — UVVVR (Чехія), тРНК з печінки кролів одержували з використанням методу фенольної депротейнізації та хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі.

Очищення PheRS з печінки кролів. Фермент одержували за методикою [7] з деякими моди-

фікаціями. Процедура очищення включала фракціонування постмітохондріального супернатанту ПЕГ-6000, дві хроматографії на гідроксіапатиті, хроматографію на фосфоцелюлозі та гепарин-сефарозі.

Для денатурації фенілаланіл-тРНК синтетази високоочищений гомогенний препарат ферменту розводили в 200 разів буфером, який містив 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ β -меркаптоетанол без додавання інших білків. Розведений фермент додатково прогрівали протягом 15 хв при температурі 42 °С. У контрольних експериментах для збереження нативності ферменту його розводили буфером, який містив 4 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

Дослідження активності PheRS. Початкові швидкості аміноацилювання тРНК досліджували при насичуючих концентраціях субстратів у 100 мкл інкубаційної суміші, яка містила 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ АТР, 150 мкг сумарної тРНК печінки кролів, 60 мкМ [¹⁴C]фенілаланін та 6,5 нМ PheRS.

В експериментах, де вивчали вплив eEF1A на активність PheRS, фактор додавали до проби в комплексі з GDP або GTP, тому в контрольні проби замість фактора додавали буфер, що містив GDP або GTP у відповідній концентрації.

Суміш інкубували протягом 3 хв при температурі 25 °С і міряли радіоактивність осаду, нерозчинного в ТХУ.

Одержання фактора елонгації 1A з печінки кролів. Печінку кроля, який голодував дві доби, гомогенізували в буфері, який містив 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂, 15 %-й гліцерин, 6 мМ β -меркаптоетанол, 2 мМ PMSF, 10 мкМ GDP. Постмітохондріальний супернатант розділяли хроматографією на колонці з сефакрилом S-400, використовуючи буфер А: 25 мМ КН₂РO₄, рН 7,5, 1 мМ MgCl₂, 15 %-й гліцерин, 6 мМ β -меркаптоетанол, 100 мкМ PMSF, 10 мкМ GDP. Активність eEF1A у фракціях визначали в реакції GDP/[³H]GTP обміну. Фракції, які містили активність фактора, наносили на колонку з ДЕАЕ-целюлозою, зрівноважену буфером А. Фракції, які не зв'язалися з колонкою та були активні в реакції GDP/[³H]GTP обміну, об'єднували і наносили на колонку з SP-сефарозою. Для елюції білків, зв'язаних з SP-сефарозою, використовували лінійний градієнт концентрації КСl від 100 до 350 мМ в буфері А. Чистоту фактора контролювали за допомогою електрофорезу в 12 %-му поліакриламідному гелі. Найактивніші фракції об'єднували, проводили діаліз протягом ночі проти буфера, що містив 50 мМ КН₂РO₄, 1 мМ MgCl₂, 6 мМ β -меркаптоетанол, 20 %-й гліцерин, і

доочищували фактор на колонці з гідроксіапатитом, використовуючи лінійний градієнт калій-фосфатного буфера від 50 до 250 мМ. Очищений фактор діалізували протягом 16 год проти 25 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ КСl, 20 %-й гліцерин, 2 мМ ДТТ, 10 мкМ GDP.

Остання хроматографія на колонці з гідроксіапатитом була важливою для очищення фактора, оскільки до цього етапу eEF1A співочищується разом з PheRS. В даній роботі використано гомогенний препарат eEF1A, який не містив домішок активності ферменту.

Для переведення фактора з GDP- у GTP-форму необхідну кількість білка інкубували протягом 15 хв при 25 °С у буфері, який містив 25 мМ трис-НСl рН 7,5, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ КСl, 20 %-й гліцерин, 6 мМ β -меркаптоетанол, 100 мкМ GTP.

Результати і обговорення. З літературних даних [8] відомо, що APCази, особливо такі мультиміріні, як PheRS, у гомогенному стані дуже лабільні, чутливі до свого макромолекулярного оточення і при розведенні до низьких концентрацій буфером, який не містить інших білків, втрачають свою активність. Для денатурації PheRS (5,2 мкМ), препарат розводили в 200 разів буфером, який містив 10 мМ трис та 10 мМ β -меркаптоетанол, і прогрівали протягом 15 хв при температурі 42 °С. Наші результати показали, що активність PheRS у реакції аміноацилювання тРНК внаслідок такої денатурації зменшувалася на 50—70 %. У контрольних пробах для запобігання денатурації PheRS фермент розводили буфером, який містив 4 мг/мл БСА (60 мкМ). Таку ж концентрацію БСА використовували й інші автори [7] для забезпечення нативності ферменту при його розведенні.

Здатність eEF1A перешкоджати денатурації було перевірено в серії експериментів, де до буфера для розведення PheRS додавали фактор елонгації. Виявилося, що за присутності вже 3,2 мкМ концентрації фактора при вказаному розведенні повністю зберігалася активність ферменту. Ці дані свідчать про те, що eEF1A при значно нижчих концентраціях, ніж БСА, здатний підтримувати активну конформацію ферменту та запобігати його денатурації при високих розведеннях.

У подальших експериментах нами показано, що eEF1A може не лише унеможливити денатурацію PheRS, а й сприяти відновленню активності денатурованого ферменту. Для цього до 25 мкл розведеного денатурованого PheRS додавали різні кількості фактора елонгації і проводили попередню інкубацію, після чого визначали активність ферменту в реакції аміноацилювання тРНК. Проведено також серію експериментів, де

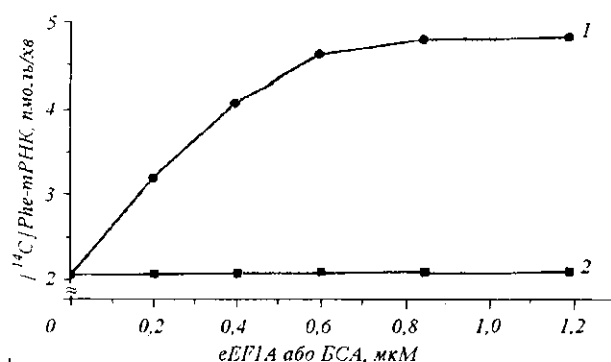


Рис. 1. Залежність ренатурації PheRS від концентрації eEF1A (1) та BSA (2)

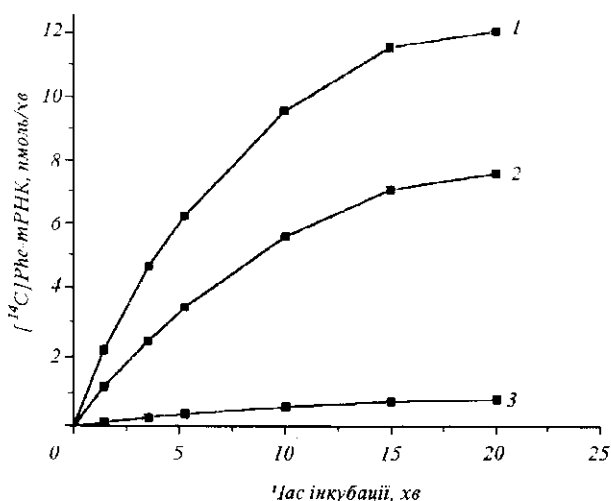


Рис. 2. Кінетика синтезу $[^{14}\text{C}]$ фенілаланіл-тРНК, що каталізується ренатурованою в присутності eEF1A PheRS (1) та денатурованою PheRS (2); 3 — ендогенна PheRS активність фактора eEF1A

досліджували залежність ефективності ренатурації від часу попередньої інкубації PheRS з фактором елонгації. Виявилось, що відновлення активності PheRS відбувається досить швидко і для повної ренатурації ферменту достатньо прогрівання протягом 3 хв при температурі 25 °С, яке необхідне при проведенні реакції аміноацилювання.

На рис. 1 наведено залежність відновлення активності денатурованої PheRS від концентрації фактора елонгації або BSA, доданого до інкубаційної суміші. Практично повне відновлення активності ферменту спостерігалось при 0,6—0,8 мкМ концентрації фактора. Треба зазначити, що ця концентрація фактора значно вища від концентрації PheRS у пробі (6,5 нМ), співвідношення

Кінетичні параметри синтезу фенілаланіл-тРНК, що каталізується денатурованою PheRS та PheRS після ренатурації в присутності фактора eEF1A

PheRS	K_M , мкМ	V_{max} , нмоль/хв	k_{cat} , хв ⁻¹	k_{cat}/K_M
Денатурована	$0,45 \pm 0,05$	$2,6 \pm 0,07$	$4,0 \pm 0,07$	$8,8 \pm 0,12$
Ренатурована в присутності eEF1A	$0,28 \pm 0,02$	$4,4 \pm 0,06$	$6,3 \pm 0,06$	$2,4 \pm 0,08$

АРС:фактор становить майже 1:100. Проте з літературних даних відомо, що в сукаріотній клітині, в якій активно відбувається біосинтез білка, концентрація фактора елонгації eEF1A складає 10—20 мкМ, а концентрація АРСаз сягає 0,2 мкМ [9]. Тобто співвідношення PheRS:eEF1A в проведених нами експериментах близьке до співвідношення АРС:фактор у цитоплазмі еукаріотної клітини. На відміну від фактора елонгації, BSA у відповідних концентраціях (0,6—0,8 мкМ) не відновлює активності денатурованої PheRS.

На рис. 2 показано швидкість синтезу $[^{14}\text{C}]$ -Phe-тРНК у реакції, що каталізується денатурованою PheRS або PheRS після ренатурації в присутності фактора елонгації. Показано зростання як швидкості, так і рівня синтезу аміноацил-тРНК у реакції з ренатурованим ферментом.

У роботі детально досліджували кінетичні параметри реакції аміноацилювання тРНК, яка каталізувалася частково денатурованою PheRS або PheRS після ренатурації. Кінетичні константи реакції аміноацилювання тРНК визначали при варіюванні концентрації від 0 до 80 мкМ сумарної тРНК або від 0 до 2,4 мкМ концентрації тРНК^{Phe}, якщо вважати, що тРНК^{Phe} складає 3 % сумарної тРНК (рис. 3). Показано, що значення коефіцієнта K_M зменшується від 0,45 до 0,28 мкМ у реакції, яка каталізується ферментом, ренатурованим у присутності eEF1A, а значення k_{cat} збільшується в 1,6 разу порівняно з таким коефіцієнтом для денатурованого ферменту. Як впливає з цих даних, відношення k_{cat}/K_M значно зростає для ренатурованої фактором PheRS, що свідчить про підвищення ефективності реакції (таблиця).

Отриманий нами фактор з печінки кролів містить одну молекулу GDP у комплексі eEF1A·GDP. Постає питання, чи здатна GTP-зв'язана форма фактора eEF1A, так само як і eEF1A·GDP, відновлювати активність PheRS. Детальні умови для переведення фактора у GTP-зв'язану форму описані в «Матеріалах і методах». Як видно з рис. 4,

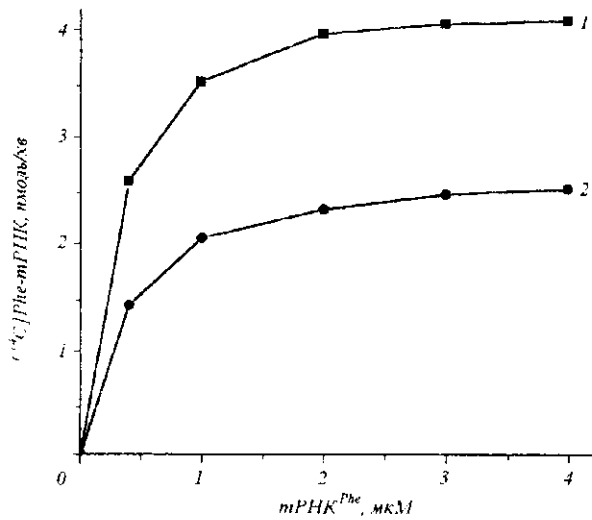


Рис. 3. Залежність швидкості синтезу [¹⁴C]фенілаланіл-тРНК від концентрації тРНК. Швидкість реакції синтезу фенілаланіл-тРНК, що каталізується PheRS після ренатурації в присутності фактора елонгації eEF1A (1) та денатурованою PheRS (2)

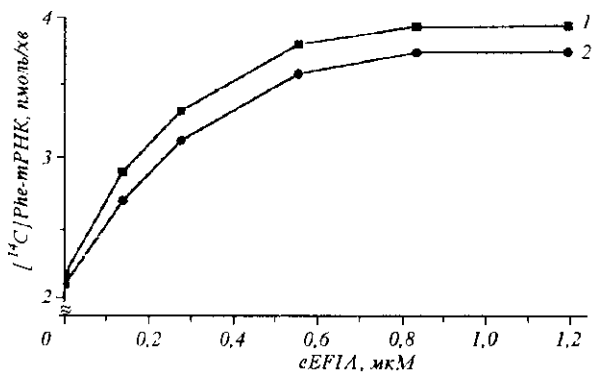


Рис. 4. Вплив eEF1A·GDP (1) та eEF1A·GTP (2) форм фактора на ренатурацію частково денатурованої PheRS

GTP- або GDP-зв'язані форми фактора в рівній мірі здатні стимулювати ренатурацію денатурованої PheRS.

Результати, представлені в даній роботі, засвідчують, що eEF1A вищих еукаріот має подібну до шаперонів здатність стимулювати відновлення активності або ренатурацію денатурованої PheRS. В опублікованих раніше нами та іншими авторами роботах показано здатність рибосом відновлювати активність денатурованих ферментів [10, 11]. Властивості шаперонів, якими наділені рибосоми та фактор елонгації, можуть свідчити на користь гіпо-

тези про котрансляційний фолдинг поліпептидів, які синтезуються [12, 13], та про участь у цьому процесі самих рибосом і фактора елонгації. В підтвердження участі фактора елонгації свідчать дані [5] про взаємодію eEF1A з наново синтезованими поліпептидами. Здатність рибосом та фактора елонгації трансляції впливати на активність PheRS може бути проявом високого рівня компартменталізації білоксинтезуючого апарату у клітинах вищих еукаріот, де спостерігається співлокалізація та асоціація компонентів апарату трансляції, в тому числі APCаз, білкових факторів трансляції та рибосом, що має значення для підтримки їхньої активної конформації.

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

Renaturation of phenylalanyl-tRNA synthetase by translation elongation factor eEF1A

Summary

Translation elongation factor eEF1A provides binding of codon-specific aminoacyl-tRNA to the ribosomal A-site. We report herewith that, in addition to its role in the translation, eEF1A has chaperone-like properties to promote renaturation of denatured phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS). The eEF1A·GDP and eEF1A·GTP complexes demonstrate the same level of activity in stimulating the enzyme renaturation. The eEF1A capacity to promote renaturation of denatured PheRS might be important for maintenance of the enzyme activity in the protein synthesis compartment in higher eukaryotic cells.

T. A. Лукаш, А. В. Турковская, Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Ренатурация фенилаланил-тРНК синтетазы фактором элонгации eEF1A

Резюме

Фактор элонгации трансляции eEF1A обеспечивает связывание кодонспецифической аминоксил-тРНК с А-сайтом рибосомы. В представленной работе показано, что, кроме своей роли в трансляции, eEF1A имеет свойства, подобные шаперонам, и обладает способностью восстанавливать активность частично денатурированной фенилаланил-тРНК синтетазы (PheRS). eEF1A·GDP и eEF1A·GTP формы фактора обладают одинаковой активностью в стимулировании ренатурации фермента. Способность eEF1A стимулировать ренатурацию денатурированной PheRS может быть важной для поддержания активной конформации фермента в клетках высших эукариот.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1α: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.—1998.—60.—P. 47—78.
2. Caldas T. D., Yaagoubis A. E., Richarme G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu // J. Biol. Chem.—1998.—273, N 19.—P. 11478—11482.
3. Kudlicki W., Coffman A., Kramer G., Hardesty B. Renaturation of rhodanese by translational elongation factor EF (Tu) // J. Biol. Chem.—1997.—272, N 51.—P. 32206—32210.

4. *Bhadula S. K., Elthon T. E., Habben J. E., Helentjaris T. G., Jiao S., Ristic Z.* Heat-stress induced synthesis of chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) in a heat-tolerant maize line // *Planta*.—2001.—212, N 3.—P. 359—366.
5. *Hotokezaka Y., Tobben U., Hotokezaka H., van Leyen K., Beatrix B., Smith D., Nakamura T., Wiedmann M.* Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides // *J. Biol. Chem.*—2002.—277, N 21.—P. 18545—18551.
6. *Petrushenko Z. M., Budkevich T. V., Shalak V. F., Negrutskii B. S., El'skaya A. V.* Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1A·GDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. Implications for tRNA channeling // *Eur. J. Biochem.*—2002.—269.—P. 4811—4818.
7. *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, N 24.—P. 15491—15496.
8. *Carias J. R., Mouricout M., Quitard B., Thomas J.-C., Julien R.* Leucyl-tRNA and arginyl-tRNA synthetases of germ. Inactivation and ribosome effect // *Eur. J. Biochem.*—1978.—87.—P. 583—590.
9. *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.
10. *Turkovskaya H. V., Belyanskaya L. L., Kovalenko M. I., El'skaya A. V.* Renaturation of rabbit liver aminoacyl-tRNA synthetases by 80S ribosomes // *Int. J. Biochem. and Cell Biol.*—1999.—31.—P. 759—768.
11. *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.
12. *Hardesty B., Tsalkova T., Kramer G.* Cotranslational folding // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1999.—9.—P. 111—114.
13. *Fedorov A. N., Baldwin T. O.* Cotranslational protein folding // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 52.—P. 32715—32718.

УДК 577.152.611:577.217.535
Надійшла до редакції 26.02.02