

Неканонічні комплекси eEF1A ссавців з деацильованими тРНК різної специфічності

П. В. Футерник, Б. С. Негруцький, Г. В. Єльська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Бул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

p.v.futernyk@imbg.org.ua

Розглянуто формування неканонічних комплексів двох ізоформ еукаріотного фактора елонгації eEF1A з деацильованими тРНК різних специфічностей та виміряно уявні константи дисоціації. Виявлено більшу спорідненість до тРНК тканиноспецифічної ізоформи фактора елонгації eEF1A2 порівняно з eEF1A1. Вперше показано принципову можливість утворення неканонічних комплексів eEF1A з ініціаторною тРНК^{Met}. Визначено роль окремих сайтів у структурі тРНК, відповідальних за взаємодію з eEF1A.

Ключові слова: трансляція, фактор елонгації, каналювання.

Вступ. Біосинтез білка включає два основних процеси – аміноацилювання тРНК та трансляцію мРНК на рибосомі. Останній процес є складно організованим, зокрема, у вищих еукаріотів. Його перебіг характеризується високим ступенем структурної та функціональної компартменталізації. Власне одним із механізмів, що реалізує потенційні переваги компартменталізації в біосинтезі білка, є каналювання [1]. Показано, що тРНК ніколи не буває вільною в клітині, вона весь час зв'язана з певними партнерами – з фактором елонгації 1A, у складі комплексу eEF1A*GTP*аміноацил-тРНК, аміноацил-тРНК синтетазою (AARS) або з рибосомою [2]. Згідно з концепцією каналювання, має місце передавання тРНК від Е-сайта рибосоми до AARS та аміноацил-тРНК – від AARS до А-сайта рибосоми без дисоціації у цитоплазму [2]. Припускають, що фактор елонгації 1A може виступати не лише як переносник аміноацил-тРНК, але й виконувати неканонічну функцію переносника деацильованої тРНК від рибосоми до AARS у складі

потрійного комплексу eEF1A*GDP*тРНК [3], існування якого вже підтверджено експериментально *in vitro*.

Раніше методом поляризації флуоресценції нами досліджено формування неканонічних потрійних комплексів фактора елонгації 1A1 з GDP та тРНК^{Phe} [4, 5], а також методом затримки смуги в ПААГ доведено формування потрійних комплексів eEF1A1 та eEF1A2 з тРНК^{Ser} [6], що свідчить про можливу універсальність зазначеного процесу.

Відомо, що у вищих еукаріотів функціонують дві ізоформи фактора елонгації – eEF1A1 та eEF1A2. Першу знайдено майже в усіх тканинах, окрім нервової та м'язової, а другу – винятково у нервовій та м'язовій, де вона з'являється у процесі онтогенезу відразу після народження [7]. До цього часу ще не виявлено функціональних відмінностей між цими двома ізоформами.

У представлений роботі ми дослідили формування неканонічних комплексів eEF1A1 та eEF1A2 з тРНК таких специфічностей: Phe, Tyr, Asp, Leu, Ile, Met, Lys, а також визначили значення уявних K_d для кожного комплексу. Окрім того, нами вперше

показано можливість формування неканонічних потрійних комплексів двох ізоформ eEF1A з ініціаторною тРНК^{Met}. За допомогою мутаційного аналізу вивчено роль специфічних сайтів у структурі тРНК, що впливають на її взаємодію з eEF1A. Для цього ми використали отримані *in vitro* транскрипти тРНК₃^{Lys}, до яких було внесено мутації у зоні Т-стебла та акцепторного стебла.

Матеріали і методи. *Матеріали.* АТР, GDP, GTP, CTP, UTP, рестриктаза *BshMI* («Fermentas», Литва); N,N-метиленбісакриламід, трис, HEPES, додецилсульфат натрію (SDS) («Helicon», РФ); -меркаптоетанол, гліцерин, NH₄Cl, MgCl₂ («Merck», Німеччина); акриламід (двічі перекристалізований), TEMED, PMSF, DTT, EDTA («Serva», Німеччина); фільтри GF/C («Whatman», Велика Британія); персульфат амонію, кумасі R-250 («Bio-Rad», Велика Британія); скінтіляційна рідина OptiPhase «HiSafe» («Sed», США); GMP, фосфодіестераза зміїної отрути PDE I Type IV із *Crotalus atrox venom* («Sigma», США); [³²P]-АТР, [U-¹⁴C]-L-тирозин, [U-¹⁴C]-L-фенілаланін, [U-¹⁴C]-L-лейцин, [U-¹⁴C]-L-ізолейцин, [U-¹⁴C]-L-аспарат, [U-¹⁴C]-L-лізин, («GE-Amersham», США); [L-¹⁴C]-L-метіонін, [L-¹⁴C]-L-пролін («Mogavec Biochemicals», США); T4-лігаза, X-Gal, T4-полінуклеотидкіназа, рестриктази *BamHI*, *HindIII* («Roche Boehringer», Німеччина); Qiagen Maxiprep Kit («Qiagen», США).

Решту реактивів маркували як «х. ч.» або «ос. ч.».

T7 РНК-полімеразу люб'язно надано проф. М. А. Тукало (ІМБІГ НАН України).

Нуклеотидилтрансферазу дріжджів виділено, як описано в роботі [8].

Отримання препаратів сумарної тРНК. Препарати сумарної тРНК з печінки бика одержували, використовуючи пряму депротейнізацію гомогенату тканини фенолом з наступною хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі [9]. Препарати індивідуальних тРНК отримували з сумарної тРНК печінки бика за схемою, яка включала хроматографію на ВД-целюлозі та в системі HPLC Gold на колонках Spherogel-TSK DEAE 5PW, C3 RPSC 5u Ultrapore та Hypersil 5C4 («Beckman», США). Ініціаторну тРНК на відміну від елонгаторної можна аміноацилювати

сумарним препаратом AARS з *Escherichia coli* з [¹⁴C]-метіоніном, що й було використано для її очищення. Препарати тРНК мітили по 3'-кінцю [³²P]-АТР за допомогою нуклеотидил-тРНК трансферази дріжджів, як описано в [10].

Препарати eEF1A1 та eEF1A2 з печінки кроля виділяли, як у роботі [4].

Метод затримки смуги в поліакриламідному гелі. Формування комплексів макромолекул досліджували методом затримки смуги у ПААГ. Інкубацію факторів елонгації та ініціації (50–2000 нМ), 200 мкМ GDP та 5000 імп/хв радіоактивно міченої тРНК проводили в 10 мкл суміші, що містила 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ DTT та 10 %-й гліцерин. Інкубацію проводили протягом 15 хв за *t* = 37 °С, після чого наносили на 5 %-й ПААГ (без денатурувальних агентів, співвідношення акриламід/N,N-метиленбісакриламід – 39/1), що готували в 25 мМ боратному буфері, рН 7,5, який містив 0,5 мМ ЕДТА та 5 %-й гліцерин. Електрофорез проводили в пластинках ПААГ розміром 0,1 × 10 × 7,5 см протягом 2 год за *t* = 4 °С та напруги 100 В. Електродний буфер використовували такий же, як і в гелі. Радіоавтографію гелю, перенесеного на папір та висушеного, здійснювали, експонуючи його протягом 18 год за температури 4 °С на плівці ОНІКО-РР1С («AGFA»). Отримані радіоавтографи аналізували за допомогою програми «GelProAnaliser».

Метод отримання мутацій в гені тРНК₃^{Lys}. Для створення конструкцій генів мутантних тРНК₃^{Lys} та контрольної тРНК₃^{Lys} – WT використано такі олігонуклеотиди:

RS101 5'-AGC TTA ATA CGA CTC ACT-3';
 RS111 5'-CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3';
 HK11 5'-ATA GCC CGG ATA GCT CAG TCG-3';
 HK21 5'-GTA GAG CAT CAG ACT TT-3';
 HK31 5'-TAA TCT GAG GGT CCA GGG TTC-3';
 HK311 5'-TAA TCT GAG GGT CCG GGG TTC-3';
 HK41 5'-AAG TCC CTG TTC GGG CGC CAG-3';
 HK411 5'-AAG TCC CTG TCC GGG CGC CAG-3';
 HK12 5'-CTA CCG ACT GAG CTA TCC GGG-3';
 HK22 5'-GAT TAA AAG TCT GAT GCT-3';
 HK32 5'-GAC TTG AAC CCT GGA CCC TCA-3';

HK321 5'-GAC TTG AAC CCC GGA CCC TCA-3';
 HK413 5'-AAG TCC TTG TTC GGG CGC CAG-3';
 HK422 5'-GAT CCT GGC GCC CGA ACA AG-3';
 HK42 5'-GAT CCT GGC GCC CGA ACA GG-3';
 HK421 5'-GAT CCT GGC GCC CGG ACA GG-3',
 синтезовані MWG-Biotech AG.

Олігонуклеотиди RS111, HK12, HK22, HK32, HK321 фосфорилювали T4-полінуклеотидкіназою, після чого гібридизували з рештою попарно з утворенням дуплексів

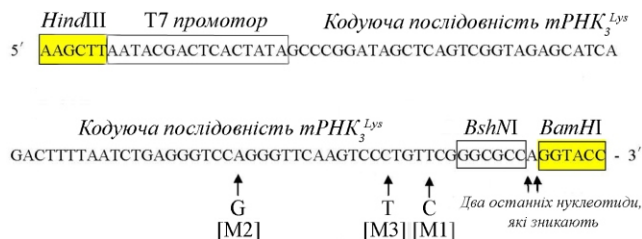
RS101 + RS11 = A;
 HK11 + HK12 = B;
 HK21 + HK22 = C;
 HK31 + HK32 = D;
 HK311 + HK321 = E;
 HK411 + HK421 = F;
 HK41 + HK42 = H;
 HK413 + HK422 = I,

гібридизованих з плазмідною *pUC18* по сайтах *Bam*HI і *Hind*III, як це показано у табл. 1, та зшитих T4-лігазою. Загальний вигляд конструкції зображено на схемі.

За допомогою отриманих плазмід трансформували компетентні клітини *E. coli* XL-1-Blue, як описано в [11]. Позитивні клони відбирали ампіциліновою та X-Gal селекцією.

З культури клітин виділяли плазмиди за допомогою Qiagen Maxiprep Kit. Послідовність перевіряли, використовуючи автоматичний секвенатор ABI 377 («Applied Biosystems», США).

T7-синтез тРНК. Плазмиди розрізали рестриктазою *Bsh*MI по сайту, що термінує синтез транскриптів так, що в їхній структурі зникають два останні нуклеотиди (С та А), тобто розмір нормальної тРНК, який становить 76 нуклеотидів,



Конструкція гена тРНК₃^{Lys}, клонованого в плазміді *pUC18*

Таблиця 1
 Варіанти модифікації гена тРНК₃^{Lys}

WT	M1 (U67:C67)	M2 (A50:G50)	M3 (C63:U63)
A	A	A	A
B	B	B	B
C	C	C	C
D	D	E	D
H	F	H	I

зменшується до 74. Таким чином ми лінеаризували плазмиду та визначили точку завершення синтезу. Синтез тРНК проводили T7 РНК-полімеразою за присутності 40 mM трис-HCl, pH 7,9, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM NaCl, 2 mM спермідину (концентрації АТР, GTP, CTP та UTP відповідали співвідношенню нуклеотидів у послідовності). Суміш обробляли ДНКазою I. Для подальшого очищення тРНК проводили хроматографію на ДЕАЕ-целюлозі (в буфері 100 mM NH₄Ac, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) та електрофорез у 10 %-му ПААГ (19:1) за присутності 7 М сечовини. Для ренатурації тРНК нагрівали до $t = 72$ C з подальшим повільним охолодженням. Активність транскриптів перевіряли в реакції аміноацилювання. Всі транскрипти мітили [³²P]АТР, як описано вище.

Результати і обговорення. Порівняння спорідненості тРНК різної специфічності до двох ізоформ eEF1A. Як зазначалося вище, тРНК ніколи не буває вільна в клітині, вона весь час зв'язана з певними партнерами – фактором елонгації 1A, у складі комплексу eEF1A*GTP*аміноацил-тРНК, AARS або рибосоמוю. На роль такого партнера для деацильованої тРНК, що має потрапити від рибосоми до AARS у циклі каналювання, запропоновано фактор елонгації 1A, що й було підтверджено експериментально [3]. Раніше методом поляризації флуоресценції нами досліджено формування неканонічних потрійних комплексів фактора елонгації 1A1 з GDP та тРНК^{Phe} [4], а також методом затримки смуги в ПААГ вивчено утворення потрійних комплексів eEF1A1 і eEF1A2 з тРНК^{Ser} [6] та виміряно уявні K_d для всіх комплексів.

У цій роботі методом затримки смуги в ПААГ ми дослідили формування неканонічних ком-

плексів eEF1A1 та eEF1A2 в GDP-зв'язаній формі з тРНК таких специфічностей: Asp (рис. 1), Ile (рис. 2), Tyr, Phe, Met, Leu, Pro (рис. 3). Спорідненість оцінювали за значенням K_d , що відображає таку концентрацію фактора елонгації, за якої половина тРНК залишається незв'язаною. Кількість вільної тРНК визначали денситометрією. З представлених даних видно, що значення K_d для комплексів eEF1A1*GDP з тРНК різних специфічностей знаходяться у межах 200–750 нМ, тоді як для комплексів eEF1A2*GDP*тРНК – в діапазоні 50–400 нМ. Майже для кожної тРНК K_d потрійного комплексу eEF1A2*GDP у 2–4 рази менша, ніж K_d для комплексів з eEF1A1*GDP. Цікаво, що у разі тРНК^{Phe} K_d рівні для обох факторів. У табл. 2 наведено узагальнені значення K_d для потрійних комплексів eEF1A*GDP*тРНК, отримані в цій та попередніх роботах [4, 6].

Зірочкою позначено результати, отримані в попередніх роботах [3, 5].

Як видно з табл. 2, отримані нами значення K_d для тРНК^{Phe} істотно відрізняються від значення K_d для тРНК^{Phe}, одержаного в попередній роботі. Але при порівнянні необхідно враховувати те, що теперішні результати відрізняються від попередніх умовами проведення розрахунків: перші отримано за нерівноважних умов на відміну від останніх, де умови були рівноважними і дослідження виконано іншим методом.

У нашій роботі доведено формування неканонічних комплексів eEF1A з деацильованими тРНК восьми різних специфічностей, що свідчить на користь універсальності запропонованого раніше механізму каналювання тРНК. Відомо, що eEF1A зв'язує всі аміноацил-тРНК з приблизно однаковою спорідненістю. Виявлену різницю у значеннях K_d комплексів eEF1A з різними тРНК для кожної ізоформи фактора елонгації можна пояснити необхідністю компенсації внеску амінокислотного залишку у потрійному комплексі eEF1A*GTP*аміноацил-тРНК.

Таким чином, утворення потрійного комплексу eEF1A*GTP*аміноацил-тРНК з однаковими термодинамічними характеристиками може бути важливим при взаємодії з рибосомою [12]. Припускається, що саме такий механізм компенсації існує і

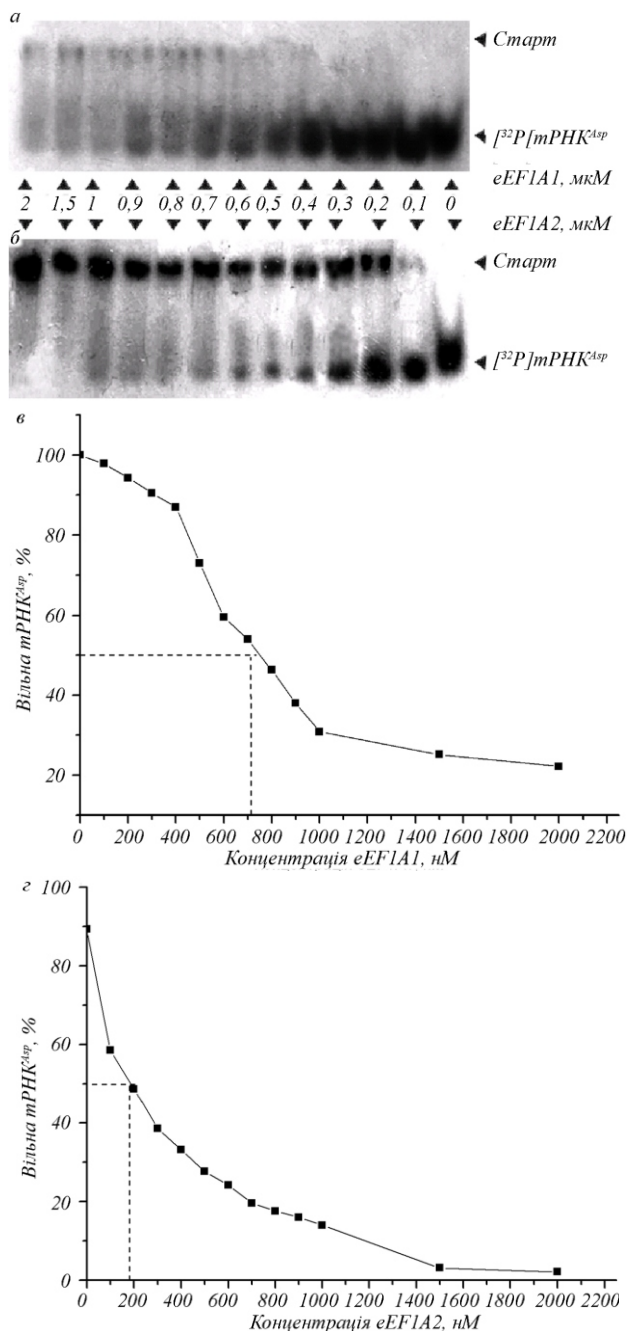


Рис. 1. Дослідження стабільності комплексів тРНК^{Asp} з eEF1A1*GDP та eEF1A2*GDP: а – радіоавтограф електрофореграми комплексу eEF1A1*GDP*тРНК^{Asp} у діапазоні концентрацій eEF1A1 від 2 до 0,1 мкМ за умов, коли білки та тРНК не денатурують; б – радіоавтограф електрофореграми комплексу eEF1A2*GDP*тРНК^{Asp} у діапазоні концентрацій eEF1A2 від 2 до 0,1 мкМ за умов, коли білки та тРНК не денатурують; в – денситометричне дослідження того ж радіоавтографа за допомогою програми GelProAnalyser (крива відображає зменшення інтенсивності вільної [³²P]тРНК^{Asp} при формуванні комплексу eEF1A1*GDP*[³²P]тРНК^{Asp}; за 100 % прийнято інтенсивність сигналу вільної [³²P]тРНК^{Asp}); г – так само, як у в, тільки для eEF1A2

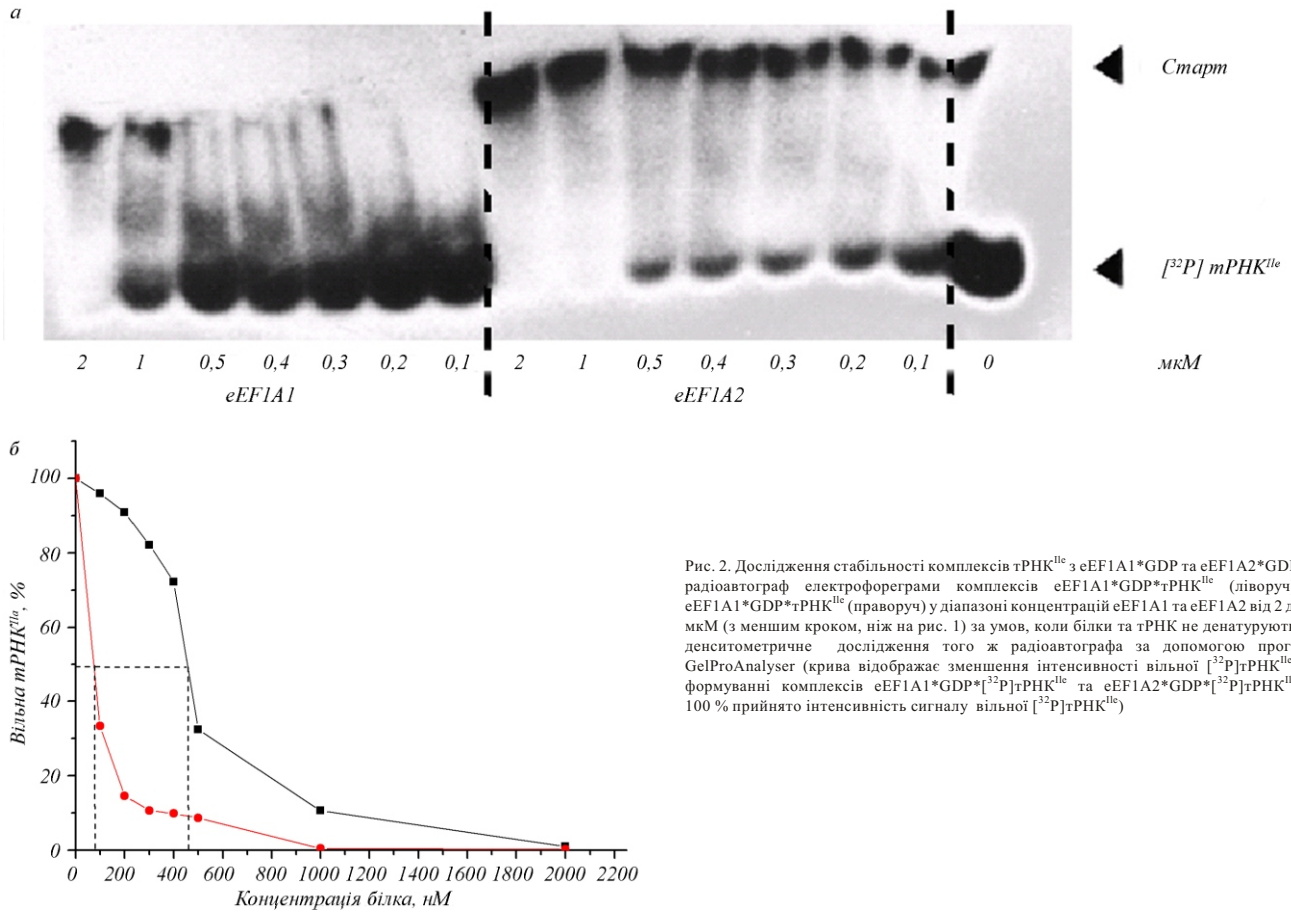


Рис. 2. Дослідження стабільності комплексів тРНК^{Met} з eEF1A1*GDP та eEF1A2*GDP: а – радіоавтограф електрофореграми комплексів eEF1A1*GDP*тРНК^{Met} (ліворуч) та eEF1A2*GDP*тРНК^{Met} (праворуч) у діапазоні концентрацій eEF1A1 та eEF1A2 від 2 до 0,1 мкМ (з меншим кроком, ніж на рис. 1) за умов, коли білки та тРНК не денатурують; б – денситометричне дослідження того ж радіоавтографа за допомогою програми GelProAnalyser (крива відображає зменшення інтенсивності вільної [³²P]тРНК^{Met} при формуванні комплексів eEF1A1*GDP*[³²P]тРНК^{Met} та eEF1A2*GDP*[³²P]тРНК^{Met}; за 100 % прийнято інтенсивність сигналу вільної [³²P]тРНК^{Met})

в прокаріотних тРНК [13]. Показано, що природа тРНК впливає на взаємодію аміноацил-тРНК з прокаріотним фактором елонгації EF1A [14].

А чим можна пояснити те, що з одним типом тРНК дві ізоформи eEF1A взаємодіють по-різному? Відповідь на це запитання ще не зовсім з'ясована. Встановлено, що eEF1A1 має в розчині розгнутішу конформацію, ніж eEF1A2 [15]. Це може бути можливим поясненням структурних відмінностей взаємодії. На жаль, отримані результати дозволяють лише припустити існування вірогідних відмінностей у функціонуванні фактора елонгації 1A у тих тканинах, з яких походять ці дві ізоформи.

Важливим є й те, що ми вперше показали можливість формування неканонічних потрійних комплексів двох ізоформ eEF1A з ініціаторною тРНК^{Met} (рис. 4). Як видно з рис. 2, такі комплекси дійсно формуються, причому їхня стабільність є практично такою ж, як і для елонгаторних тРНК.

Так, для комплексу eEF1A1*GDP*тРНК^{Met} K_d становить 370 нМ, а для комплексу eEF1A2*GDP*тРНК^{Met} вона дорівнює 250 нМ, тобто така тРНК взаємодіє з фактором елонгації навіть краще, ніж деякі елонгаторні тРНК, у тому числі й тРНК^{Met}. Формування неканонічних комплексів фактора елонгації 1A з деацильованою ініціаторною тРНК виявилось дещо дивним, оскільки існування подібного комплексу не прогнозувалося [16]. Більше того, показано, що Met-тРНК^{Met} не може бути використана як елонгаторна тРНК у безклітинній білок-синтезувальній системі. Визначено, що тРНК^{Met} ссавців має два сайти, що виконують функцію антидетермінант фактора елонгації 1A: на акцепторному стеблі – A1:U72, в Т-стеблі – A50:U64 та U51:A63 [17]. З іншого боку, у Met-тРНК^{Met} рослин та дріжджів антидетермінантою фактора елонгації слугує посттрансляційна модифікація A64 – 2-О-рибозилування, яка також розташована на Т-стеблі [18]. Імовірно, що

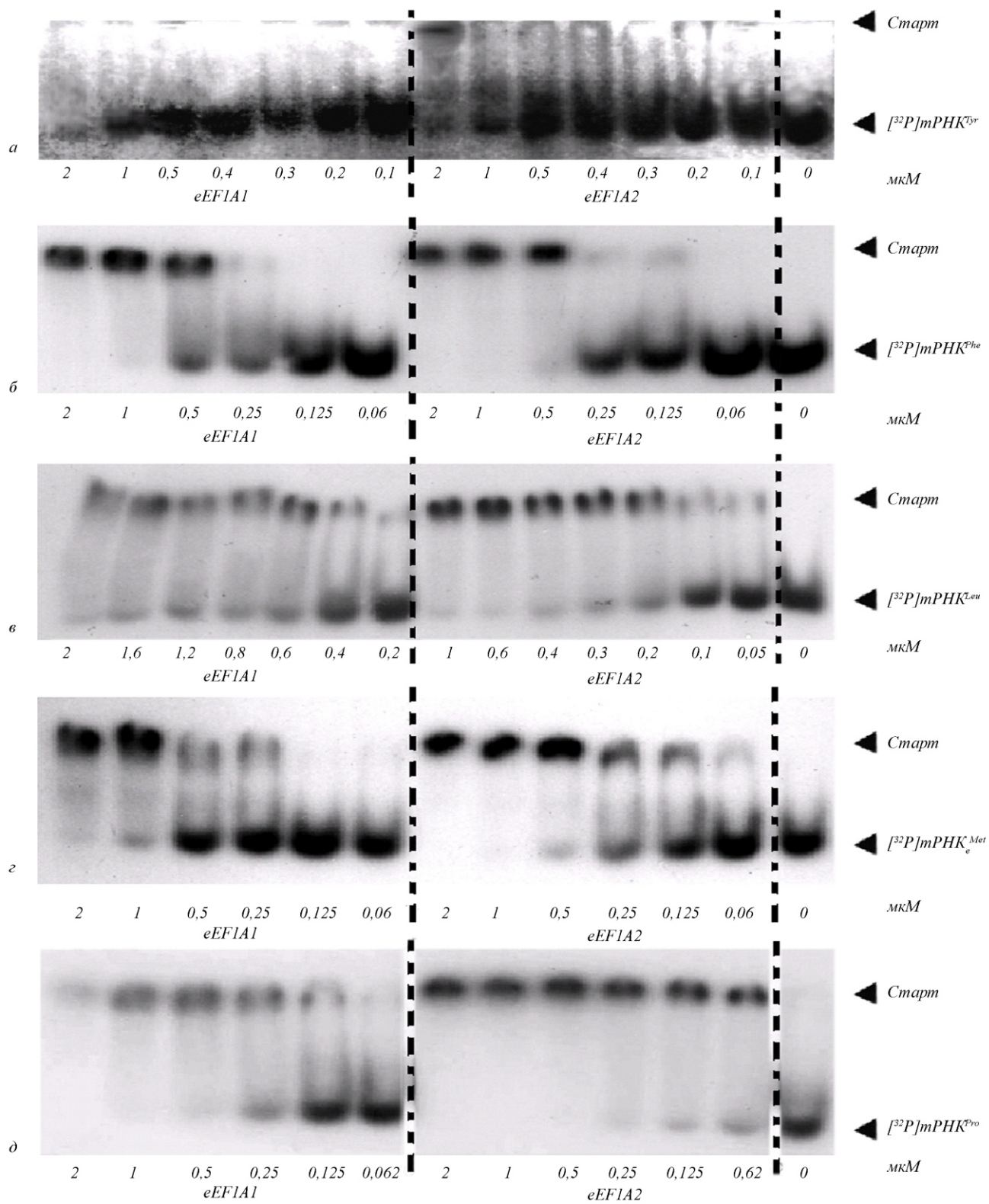


Рис. 3. Стабільність комплексів тРНК*еEF1A1*GDP/еEF1A2*GDP з різними елонгаторними тРНК. Радиоавтографи електрофореграм для: а – тРНК^{Tyr}; б – тРНК^{Phe}; в – тРНК^{Leu}; г – тРНК^{Met}; д – тРНК^{Pro}

Таблиця 2

Узагальнене порівняння спорідненості ізоформ eEF1A до різних тРНК

тРНК	K_d , нМ	
	eEF1A1	eEF1A2
Pro	200	50
Phe	250	250
Phe	9*	–
Tyr	750	400
Ile	470	100
Met _c	700	300
Leu	600	150
Ser	350*	120*
Asp	750	250
Met _i	370	250

Зірочкою позначено результати, отримані в попередніх роботах [3, 5].

Таблиця 3

Порівняння спорідненості комплексів факторів трансляції з GDP до елонгаторних та ініціаторної тРНК^{Met}

Комплекс	K_d , нМ		
	тРНК _c ^{Met}	тРНК _i ^{Met}	тРНК ^{Leu}
eIF2*GDP	100	160	>1500
eEF1A1*GDP	600	370	600
eEF1A2*GDP	250	250	150

взаємодії фактора елонгації з Met-тРНК_i^{Met} не відбувається через відсутність контакту з амінокислотним залишком (що, до речі, розташований в елонгаторній Met-тРНК_c^{Met} під іншим кутом відносно акцепторного стебла). Наявність сайту U51:A63 в Т-стеблі тРНК, вочевидь, є недостатньою антидетермінантою фактора елонгації, що і є, на нашу думку, причиною формування виявленого нами неканонічного комплексу eEF1A*GDP*тРНК_i^{Met}.

Значення утворення комплексу eEF1A1/eEF1A2*GDP*тРНК_i^{Met} полягає, скоріш за все, у можливості використання eEF1A для каналювання ініціаторної тРНК після того, як вона залишає Е-сайт рибосоми та, ймовірно, саме у складі такого потрібного комплексу потрапляє до AARS. Поряд з цим, з'ясована нами раніше здатність фактора ініціації eIF2, -субодиниця якого є гомологом eEF1A, взаємодіяти з деацильованими тРНК_i^{Met} і тРНК_c^{Met} та не взаємодіяти з іншими елонгаторними тРНК [19], доповнює цей механізм ще однією ланкою. Результат порівняння значень K_d для цих комплексів разом з відповідними значеннями для eEF1A1 та eEF1A2 наведено у табл. 3. Як видно, значення K_d для потрібних комплексів ізоформи фактора елонгації 1A є значно більшими, ніж її значення для комплексів eIF2*GDP з тРНК_c^{Met} і тРНК_i^{Met}, що, на нашу думку, не заважає фактору елонгації взаємодіяти з усіма деацильованими тРНК та доставляти їх у складі потрібного комплексу до AARS. Отже, отримані результати можуть бути ще одним доказом на користь каналю-

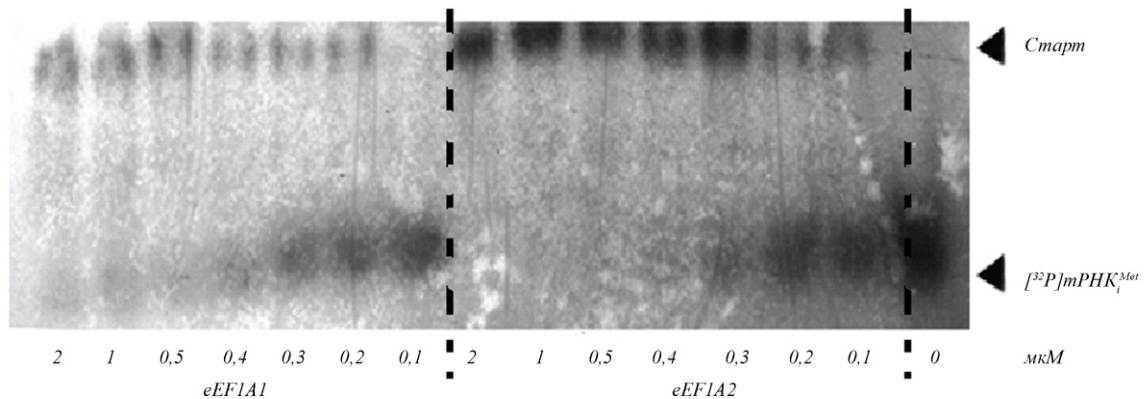


Рис. 4. Стабільність комплексів тРНК_i^{Met}*eEF1A1/eEF1A2*GDP (радіоавтограф електрофореграми)

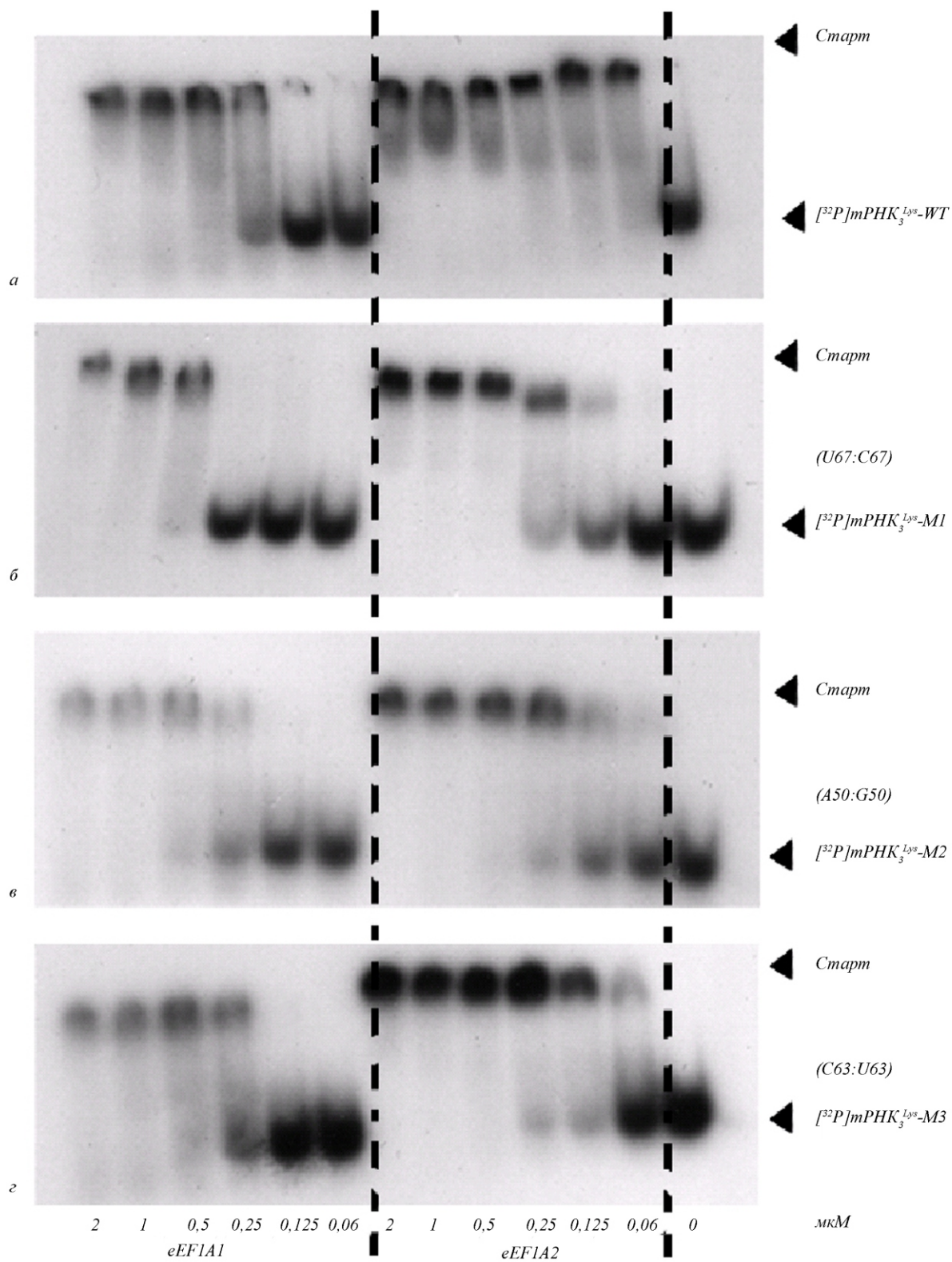


Рис. 5. Стабільність комплексів тРНК*еEF1A1/еEF1A2*GDP (радіоавтографи електрофореграм): а – тРНК^{Lys}-WT; б – тРНК^{Lys}-M1; в – тРНК^{Lys}-M2; г – тРНК^{Lys}-M3

Таблиця 4
Порівняння спорідненості нормальної та мутантних тРНК_{3^{Lys}} до двох ізоформ eEF1A

тРНК	K _d , нМ	
	eEF1A1	eEF1A2
LysWT	250	30
LysM1 (U67:C67)	330	120
LysM2 (A50:G50)	400	170
LysM3 (C63:U63)	250	100

вання тРНК у процесі трансляції як на етапі елонгації, так і під час ініціації.

Визначення ролі G:U-пар в положеннях 51:63 та 50:64 у взаємодії тРНК з фактором елонгації 1A. Нещодавно визначено сайти на тРНК та протекторному EF1A, відповідальні за взаємодію з тРНК [13]. Як виявилось, G:C-пара у положенні 63:51 у Т-стеблі тРНК має більшу перевагу, ніж A:U. Відомо, що серед тРНК ссавців лише тРНК_{QUU}^{Asn}, тРНК_{UGA}^{Ser} і тРНК_i^{Met} містять A:U пару в положенні 63:51, а тРНК^{Phe} і тРНК^{Tyr} мають G:U.

Щоб з'ясувати механізм взаємодії фактора елонгації з різними тРНК нами встановлено роль окремих сайтів на молекулі тРНК, які впливають на її взаємодію з eEF1A. Мутації вводили в структуру тРНК_{3^{Lys}} у спосіб, описаний в «Матеріалах і методах». Мутантні та нормальна тРНК мали однакову активність у реакції аміноацилювання. Методом затримки смуги в ПААГ ми дослідили спорідненість мутантних тРНК до обох ізоформ eEF1A (рис. 5). Результати свідчать про незначний внесок введення G:U-пар у взаємодію з eEF1A1. Введення G:U-пар в положенні 51:63 не змінює K_d, а в положенні 50:64 – збільшує її з 250 до 400 нМ, тобто менш ніж у 2 рази. Для комплексу з eEF1A2 наявність G:U-пари в положенні 50:64 збільшує K_d з 30 до 170 нМ, а в положенні 51:63 – до 100 нМ, тобто в 5,5 та 3 рази відповідно.

Таким чином, ми встановили, що сайти 63:51 та 64:50 в елонгаторній тРНК_{3^{Lys}} є важливими для взаємодії тРНК з eEF1A. Як з'ясувалося, більше значення вони мають для eEF1A2, де спорідненість до тРНК зменшується навіть при заміні U64:A50 на більш вигідну U64:G50-пару приблизно у 5 разів, а

заміна C63:G51 на U63:G51 призводить до зменшення спорідненості у 3 рази (дані наведено у порівняльній табл. 4).

Виявлена різниця між значеннями K_d потрійних комплексів різних мутантних форм тРНК і тРНК дикого типу, а також неоднакова спорідненість однієї тРНК до різних ізоформ фактора елонгації є свідченням того, що внесок у цю взаємодію робить як структура тРНК, так і особливості структури eEF1A.

Отже, ми з'ясували, що формування неканонічних комплексів тРНК з eEF1A*GDP характеризується універсальністю і властиве всім елонгаторним тРНК, такі комплекси притаманні також обома ізоформам фактора елонгації. До того ж нами виявлено можливість утворення неканонічних потрійних комплексів ініціаторної тРНК з обома ізоформами фактора елонгації. Ми встановили, що eEF1A2 формує неканонічні комплекси з вищою афінністю, ніж eEF1A1, майже з усіма досліджуваними деацильованими тРНК. Нами вивчено елементи тРНК, відповідальні за зв'язування фактора елонгації 1A, і з'ясовано, що заміна пар G64:C50 на G64:U50 і C63:G50 на U63:G50 в Т-стеблі призводить до суттєвого зниження спорідненості тРНК_{3^{Lys}} до обох ізоформ фактора елонгації 1A. Це засвідчує особливу роль зазначених сайтів у формуванні неканонічних комплексів тРНК*eEF1A*GDP.

Окрему подяку висловлюємо О. В. Новосильній за допомогу при очищенні препаратів факторів елонгації.

Дослідження частково підтримано Програмою з фінансування спільних проектів НАН України і РФФД 2008–2009 рр. (дог. 21).

P. V. Futernyk, B. S. Negrutskii, G. V. El'ska

Noncanonical complexes of mammalian eEF1A with various deacylated tRNAs

Summary

The formation of noncanonical complexes of two eEF1A isoforms with different types of deacylated tRNAs was examined and apparent dissociation constants were measured. A higher affinity to tRNA was found for the tissue specific isoform of elongation factor eEF1A2, as compared with that of eEF1A1. For the first time the formation of noncanonic complex of eEF1A with initiator tRNA_i^{Met} was found to be possible. A specific role of some tRNA sites in the interaction with eEF1A was discovered.

Keywords: translation, elongation factor 1A, channeling.

П. В. Футерник, Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Неканонические комплексы eEF1A млекопитающих с деацелированными тРНК разной специфичности

Резюме

Рассмотрено формирование неканонических комплексов двух изоформ фактора элонгации eEF1A с деацелированными тРНК разных специфичностей и измерены кажущиеся константы диссоциации. Выявлено большее сродство к тРНК тканеспецифической изоформы фактора элонгации eEF1A2 по сравнению с eEF1A1. Впервые показана принципиальная возможность образования неканонических комплексов eEF1A с инициаторной тРНК_i^{Met}. Определена роль отдельных сайтов в структуре тРНК, ответственных за взаимодействие с eEF1A.

Ключевые слова: трансляция, фактор елонгації 1А, каналізування.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Negrutskii B. S., Deutscher M. P. Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1991.—**88**.—P. 4991–4995.
3. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1A: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*—1998.—**60**.—P. 48–77.
4. 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-1 with GDP and deacylated tRNA // *FEBS Lett.*—1997.—**407**.—P. 13–17.
5. 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.
6. Футерник П. В., Погрібна А. П., Петрушенко З. М., Негруцький Б. С., Єльська Г. В. Дослідження комплексів фактора елонгації 1А з тРНК^{Cер} та серил-тРНК синтетазою // *Біополімери і клітина*.—2004.—**20**, № 1–2.—С. 17–23.
7. Newbery H. J., Loh D. H., O'Donoghue J. E., Tomlinson V. A. L., Chau Y.-Y., Boyd J. A., Bergmann J. H., Brownstein D., Abbott C. M. Translation elongation factor eEF1A2 is

essential for post-weaning survival in mice // *J. Biol. Chem.*—2007.—**282**.—P. 28951–28959.

8. Sternbach H., von der Haar F., Schlimme E., Gaertner E., Cramer F. Isolation and properties of tRNA nucleotidyl transferase from yeast // *Eur. J. Biochem.*—1971.—**22**.—P. 166–172.
9. Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1962.—**8**.—P. 1–3.
10. Silberclang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L. Use of *in vitro* ³²P labeling in the sequence analysis of nonradioactive tRNAs // *Meth. Enzymol.*—1979.—**59**.—P. 58–109.
11. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
12. Louie A., Ribeiro S. N., Reid B. R., Jurnak F. Relative affinities of all *Escherichia coli* aminoacyl-tRNAs for elongation factor Tu-GTP // *J. Biol. Chem.*—1984.—**259**.—P. 5010–5016.
13. LaRiviere F. J., Wolfson A. D., Uhlenbeck O. C. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation // *Science*.—2001.—**294**.—P. 165–168.
14. Sanderson L. E., Uhlenbeck O. C. The 51-63 pair of tRNA confers specificity for binding by EF-Tu // *RNA*.—2007.—**13**.—P. 835–840.
15. Budkevich T. V., Timchenko A. A., Tiktopulo E. I., Negrutskii B. S., Shalak V. F., Petrushenko Z. M., Aksenov V. L., Willumeit R., Kohlbrecher J., Serdyuk I. N., El'skaya A. V. Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1A in solution // *Biochemistry*.—2002.—**41**.—P. 5342–5349.
16. Stortchevoi A., Varshney U., RajBhandary U. L. Common location of determinants in initiator transfer RNAs for initiator-elongator discrimination in bacteria and in eukaryotes // *J. Biol. Chem.*—2003.—**278**.—P. 17672–17679.
17. Drabkin H. J., Estrella M., RajBhandary U. L. Initiator-elongator discrimination in vertebrate tRNAs for protein synthesis // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—**18**.—P. 1459–1466.
18. Kiesewetter S., Ott G., Sprinzl M. The role of modified purine 64 in initiator/elongator discrimination of tRNA_i^{Met} from yeast and wheat germ // *Nucl. Acids Res.*—1990.—**18**.—P. 4677–4682.
19. Футерник П. В., Негруцький Б. С., Єльська Г. В. Формування неканонічних комплексів тРНК_i^{Met} та тРНК_e^{Met} з фактором ініціації 2 ссавців / *Наук. вісн. Чернів. ун-ту: Зб. наук. праць (Біологія)*.—Чернівці: Рута, 2006.—Вип. 297.—С. 3–7.

УДК 577.217: 577.112.7
Надійшла до редакції 18.10.07