

УДК 577.113.5 + 577.21

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТРАНСЛЯЦІЙНИХ ПЕРЕКЛЮЧЕНЬ НА РИБОСОМАХ КЛІТИНИ

Л. Калачнюк

Науково-дослідний інститут
біотехнологічних основ підвищення продуктивності тварин
Львівської національної академії ветеринарної медицини ім.С.З. Гжицького
вул. Пекарська 50, Львів 79010, Україна
e-mail: lilimarg@polynet.lviv.ua

Протеїни, які зв'язуються з тмРНК, відіграють важливу роль у молекулярних механізмах трансляції й трансляційних переключень на рибосомах клітини *Escherichia coli*. Утворення комплексу тмРНК-зв'язувального протеїну із тмРНК дає змогу тмРНК "прикріплюватись" до рибосоми та виконувати свої подвійні функції тРНК і тмРНК у транс-трансляційному процесі.

Ключові слова: біосинтез білка, рибосома, тмРНК-зв'язувальний протеїн, мРНК, тРНК, тмРНК, транс-трансляційний процес, *Escherichia coli*.

Відкриття поодиноких протеїнових мономерів, трансльованих з двох окремих РНК, важливі для розуміння того, як генетичний матеріал закодований у послідовність білка. Типовим є те, що рибосомна машина транслює послідовність РНК зі стартового сайту до стоп-кодону на одній молекулі мРНК так, щоб протеїновий продукт відповідав суто лінійній рамці "зчитування", яку регулює генетичний код.

А коли протеїни отримують повідомлення смерті під час їхнього народження? З часів виникнення живої матерії існують і шляхи контролювання її якості, які працюють на молекулярному рівні, й нині життя без них не може функціонувати нормально. Протеїни з помилками можуть бути або знищеними, або "вилікуваними": їх елімінують протеолітичні ензими або відновлені молекулярні шаперони [4]. Відхилені від норми поліпептиди зчитуються з мРНК, яка має дефект(-и), однак вони не здатні репаруватись, і для таких протеїнів єдиним вибором є знищення. Наприкінці ХХ ст. [5] описано приголомшливий новий механізм контролювання якості для протеїнів у бактеріальних клітинах, які точно виконують цю функцію. Через збудження попередньо невідомого рибосомального трансляційного механізму незрілі поліпептиди (що транслювались із "урізаних" мРНК, у яких не було стоп-кодону) отримували короткі *tag*-пептиди (із послідовністю AlaAlaAsnAsp-GluTyrAlaLeuAlaAla) на СООН-кінці білкових молекул, і такі утворені фузійні поліпептиди ставали мішенню для ензимів, що деградують. Ця нова послідовність, окрім першої амінокислоти – аланіну, кодована малою (362 нуклеотиди) стабільною РНК, відомою як 10Sa РНК, що експресується із *ssrA*-гена. Частина 10 Sa РНК має просторову тРНК-подібну форму і може переносити аланін [6].

Відкриття на карбоксильному кінці багатьох білків спільної послідовності з 11 амінокислот (або *tag*-послідовності), яка відповідальна за деградацію в *Escherichia coli*, наводить на думку, що рибосома може переключитися з однієї молекули РНК на іншу. Перша з 11 амінокислот (так звана з'єднувальна амінокислота) не має справжнього кодону, тоді як останні 10 амінокислот *tag*-послідовності "зчитуються" із кодонів на 10Sa РНК за допомогою транспортних РНК.

Праці А. Муто, Р. Сімсона і Р. Саурера [1, 3, 5, 7, 8] свідчать про інтригуючий механізм, за допомогою якого 10Sa РНК діє як транспортна РНК (тобто вона відповідальна за перенесення амінокислот до поліпептидного ланцюга, що зростає) і як мРНК. Така ж *tag*-послідовність з 11 амінокислот на карбоксильному кінці виявлена на врізаному інтерлейкіні-6 миші, синтезованому в *E. coli*, на лямбда сІ і на b-562, коли вони трансклювалися на мРНК-ах без стоп-кодонів [8] та на поліфенілаланіні, синтезованому *in vitro* з використанням поліуридинової кислоти як матриці [3]. З урахуванням двоякої функції 10Sa РНК Стефан Йентц запропонував назвати її транспортно-матрицевою РНК (або тмРНК) [4].

Дуже важливим для розуміння такого рибосомального переключення (або трансляції; такий термін запроваджений професором Акірою Муто із Хіросакського університету в Японії) [7] є дослідження взаємодії тмРНК і білків, які зв'язуються з тмРНК, – чому і присвячена ця стаття.

Штами та умови культивування. Штами *Escherichia coli* W3110 (дикий штам) та її похідний мутант W3110 Δ ssgA (у якому нема гена тмРНК) люб'язно надані Г. Інокучі із Киотського університету (Японія). Клітини культивували в Лурія-Бертані ростовому середовищі [9] при 37°C за інтенсивної аерації. Клітини, які досягли mid-log-фази, збирали центрифугуванням (6 000 об/хв, 5 хв, 4°C). Їх промивали охолодженим (~до 4°C) ТМК-1 буфером (10 мМ Tris-HCl, 10 мМ MgCl₂, 60 мМ KCl, 6 мМ 2-меркаптоетанол, рН 7,8) і зберігали при -80°C. Передусім для виділення рибосомального тмРНК-зв'язувального протеїну були потрібні тмРНК та аланіл-тРНК синтетаза, процедури одержання яких описані нижче.

Виділення тмРНК. Як відомо 10SaРНК (тмРНК) є одною із найнестабільніших РНК, що знайдені в *E. coli*. Ця РНК кодована одним геном (ssgA), що локалізований на 56,5-й хвилині генетичної мапи *E. coli* та продукована на близько 1000 копій на гаплоїдний генотип [9]. З метою виділення тмРНК у достатньо великих кількостях для експериментальних досліджень уведено мутації в штам *E. coli* W3110 Δ ssgA згідно з працями Й. Коміне, А. Муто [6, 9].

Зв'язування з рибосомою. Заморожені клітини *E. coli* W3110 (близько 0,5 г) розтирали з такою ж кількістю “алюмінієвої пудри” та екстрагували за допомогою 1 мл ТМК-2 буфера (10 мМ Tris-HCl, рН 7,6; 10 мМ MgCl₂, 300 мМ KCl, 6 мМ 2-меркаптоетанол), що містив 50 U ДНКазу I (FPLC pure, Pharmacia-LKB, Sweden). Екстракт центрифугували при 12 000 об/хв упродовж 5 хв для видалення залишків клітин та “алюмінієвої пудри”. Порцію (0,5 мл) надосадової фракції (супернатанту) наносили на 5–20% лінійний градієнт сахарози (25 мл), приготований на ТМК-2 буфері. Далі проводили центрифугування при 22 000 об/хв упродовж 6 год при 4°C (ротатор Hitachi RPS-25, Japan). Фракції (1 мл) збирали із дна пробірки. Для вимірювання оптичної густини при $\lambda=260$ нм відбирали аліквоти об'ємом 0,2 мл.

Нуклеїнові кислоти виділяли із кожної фракції фенольною екстракцією й осадженням етанолу, а далі розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5% (w/v) агарозному гелі, що містив 6,3% формальдегіду, а потім прикріплювали на нейлонову мембрану (Hybond-N⁺, Amersham, USA). Виявляли тмРНК за [9] за допомогою Northern-гібридизації з використанням 3'-діоксигенін міченого олігодезоксирибонуклеотиду, комплементарного до фрагмента тмРНК послідовності (від 251 до 280 нуклеотиду).

Виділення аланіл-тРНК синтетази (Ала-РС) та аміноацилювання аланіном. Аланіл-тРНК синтетазонадпродукувальний штам *E. coli* [3] люб'язно наданий Х. Хімено

(Хіросакський університет, Японія). Аланіл-тРНК синтетазу отримували згідно з методами [2, 3]. Реакцію аміноацилювання проводили при 37°C в 50 мкл реакційної суміші, що містила 60 мМ *trp*-HCl рН7,5, 10 мМ магнію хлориду, 10 мМ дитіотреїтол (ДТТ), 0,1 мг/мл альбуміну сироватки бика, 2,5 мМ АТР, 26,2 мкМ L-[U-¹⁴C]аланін (5,62 ГБк/ммоль, NEN Life Science Products, Japan), 1 мкг тмРНК і $9,1 \times 10^{-2}$ U аланіл-тРНК синтетази (за одну одиницю активності аланіл-тРНК синтетази приймали таку кількість ензиму, яка каталізує включення 1 нмоль аланіну в тРНК^{Ala} за 10 хв). У визначений час відбирали 9,5 мкл аліквоти і наносили на паперові Whatman 3ММ-фільтри, а радіоактивність нерозчинної трихлороцтовою кислотою фракції вимірювали за допомогою рідинно-сцинтиляційного лічильника.

Виділення тмРНК-зв'язувального протеїну (рП). Передкультивация *E. coli* (використовували той же штам, що і для виділення аланіл-тРНК синтетази): до 50 мл LB-середовища (приготований з розрахунку на 1 л 10 г бактотриптон, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl, рН 7,0; рН доводили до наведеного значення за допомогою 5 Н розчину NaOH, ~0,2 мл) додавали 50 мкл канаміцину (антибіотик з розрахунку 1:1 000), після чого вносили клітини штаму *E. coli* й інкубували при 37°C упродовж ночі.

Культивация: до 6 л LB-середовища вводили нічну передкультуру та канаміцин (із розрахунку 50 мл та 1 мл на 2 л ростового середовища) та інкубували при 37°C за інтенсивної аерації до 0,6 опт. од. при $\lambda=600$ нм, далі індукували 1 мМ ізопропіл-1-тіо- β -D-галактопіранозидом (ШПГ) і продовжували вирощувати клітини впродовж наступних трьох годин за зазначених умов. Клітини збирали центрифугуванням (6 000 об/хв, 5–10 хв, 4°C), ресуспендували у 150 мл буфера, який містив 20 мМ *trp*-HCl рН 7,5, 10 мМ магній ацетату, 2 мМ калій ацетату, 2 мМ дТТ, 100 мкг/мл фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ; активний проти хімотрипсину і трипсину), 2 мкг/мл леупетину (суміш 3:1 пропіонілових та ацетильних залишків, активна проти плазміну, трипсину, папаїну й катепсину В), 1 мкг/мл пепстатину А (активний проти пепсину і катепсину D) і двічі центрифугували при 6 000 об/хв упродовж 5 хв. Осад клітин зберігали при 4°C до наступного етапу.

Руйнували клітини осаду за допомогою розтирання їх з такою ж кількістю “алюмінієвої пудри” у зазначеному вище буфері (у кінці процедури доводячи об'єм до 30 мл). Для вивільнення від залишків клітин і “алюмінієвої пудри” центрифугували спершу при 8 000 об/хв протягом 20 хв при 4°C, а потім – ультрацентрифугували при 50 000 об/хв (159000xg, ротор Р65А) протягом 3 год. при 4°C. Одержаний (“просвітлений”) супернатант (S100) наносили на колонку з носієм DEAE-Toyorearl 650 (TOSOH, Japan) і виконували хроматографію з метою одержання аланіл-тРНК синтетази, яку виявляли за допомогою реакції аміноацилювання, та одного з рибосомальних протеїнів (тмРНК-зв'язувальний протеїн або рП), який виявляли з використанням прийому “детекції зсуву електрофоретичних смуг” досліджуваного матеріалу (або ж “gel-mobility shift assay”). Активні фракції збирали разом і після концентрування далі очищали за допомогою препаративного електрофорезу на поліакриламідному гелі (4% РААГ-концентрувальний гель, 10% РААГ-роздільний гель) за нативних умов при 4°C. Після завершення електрофорезу (про яке можна судити за фронтом фарби буфера, в якому наносили протеїнові проби, та тривалістю електрофорезу) проводили електроелекцію з одночасним фракціонуванням (об'єм фракції 250 мкл) проб зі швидкістю 100 мкл/хв. Про наявність тмРНК-зв'язувального протеїну свідчили результати спеціального методичного прийому, описаного нижче.

Чистоту одержаного протеїну оцінювали за допомогою електрофорезу в денатурувальних умовах на поліакриламідному гелі (SDS-PAAG; 5% PAAG-концентрувальний гель, 10% PAAG-роздільний гель), який далі фарбували Coomassie Brilliant Blue або Silver Stain II Kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan).

Виявлення рибосомального тмРНК-зв'язувального протеїну. Рибосомальний тмРНК-зв'язувальний протеїн виявляли за допомогою методичного підходу детекції утвореного комплексу протеїну із тмРНК за зсувом спектра електрофоретичних смуг (або "gel-mobility shift assay").

Дефосфорильовану Т4 лужною фосфатазою (Takara, Japan) тмРНК фосфорильовали [γ - 32 P] АТР за допомогою Т4 полінуклеотид кінрази (Takara, Japan). Реакційна суміш (20 мкл) містила 50 000 с.р.м. [γ - 32 P]тмРНК з різною кількістю досліджуваного протеїну у 10 мМ *trис*-HCl (pH 7,6), 100 мМ амонію хлориду, 100 мМ магнію ацетату, 1 мМ ДТТ, 0,02% NP-40 і 100 мг/мл альбуміну сироватки бика. Після інкубації при 0°C упродовж 30 хв суміш наносили на SDS-PAAG (5% PAAG-концентрувальний гель, 10% PAAG-роздільний гель) у *trис*-гліциновому буфері (25 мМ *trис*-HCl pH 7,6; 190 мМ гліцин; 1 мМ EDTA; 2,5% гліцерол). Радіоактивність на гелі визначали за допомогою Bio-Image Analyzer BAS3000 (Fuji Film, Japan).

Визначення деталей того, як працює рибосома під час транс-трансляції, дасть змогу зрозуміти механізм рециркулювання рибосом та, можливо, уявити, як *E. coli* транслює неповні мРНК. З огляду на це дуже важливо виділити та вивчити тмРНК-зв'язувальні протеїни. На рис. 1 показано простий підхід, за допомогою якого можна довести взаємодію тмРНК із рибосомою, а отже, і рибосомними білками, що мають афінну спорідненість до цієї нуклеїнової кислоти. Розділення екстракту клітин центрифугуванням у лінійному градієнті сахарози (див. рис. 1, А-1) та визначення розподілу тмРНК за допомогою Northern-гібридизації (рис. 1, А-2) засвідчили, що значна кількість тмРНК дикого штаму *E. coli* співседиментується із 70S рибосомою, що підтверджує дані [6, 9]. Усе це наводить

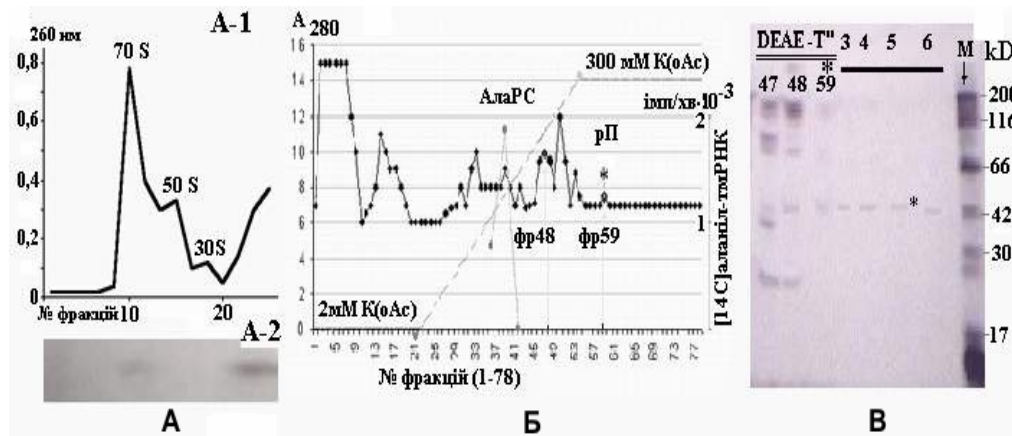


Рис. 1. А – Зв'язування тмРНК із рибосомою, де крива A_{260} (А-1), Northern-гібридизація тмРНК (А-2) із 3'-DIG-міченим олігодезоксирибонуклетидом; Б – хроматографія S100 на колонці (2×30 см) з носієм DEAE-Toyorearl 650 лінійним градієнтом калій ацетату [2–300 мМ К (оAc)] для фракцій 21-54, об'єм фракції 8 мл, швидкість елюції 16 мл/год, 4°C; В – електрофореграма білків фракцій у разі хроматографії на колонці з носієм DEAE-Toyorearl 650 (Фр. 47, 48, 59) та фракцій протеїнового елюату після препаративного електрофорезу в ПААГ за нативних умов (Фр. 3-6).

на думку, що тмРНК утворює комплекс з рибосомальними білками або ж одним із рибосомальних білків, а S100-фракція (див. рис. 1) є найліпшим кандидатом для виділення тмРНК-зв'язувальних протеїнів (аланіл-тРНК синтетази та рибосомальних протеїнів). Ось чому, насамперед, привернула увагу схема очищення аланіл-тРНК синтетази [2, 7] (однією із функцій якої є зв'язування з тмРНК) і особливо високоефективного фракціонування за допомогою хроматографії на колонці з носієм DEAE-Toyopearl 650 (див. рис. 1, Б). Якщо елюція аланіл-тРНК синтетази відбувалася при 156 мМ калій ацетату, то одного тмРНК-зв'язувального протеїну – при 170 мМ, а іншого – при 300 мМ. Як видно із результатів електрофорезу в денатурувальних умовах на поліакриламідному гелі (див. рис. 1, В, фр. 59), 59 хроматографічна фракція має менше домішок, тому її й вибрано для додаткового очищення за допомогою препаративного електрофорезу в нативних умовах, після якого отримано тмРНК-зв'язувальний протеїн білок 95 % чистоти (див. рис. 1, В, фр. 4-6). Високоочищений протеїн давав смугу близько 40 kD у разі електрофорезу в SDS-РААГ у денатурувальних умовах (рис. 1, В).

Взаємодію рП із тмРНК вивчали за допомогою використання електрофоретичного прийому ("gel-mobility shift assay"; рис. 2. А). З рис. 2, Б видно, що зростання концентрацій протеїну веде до підвищеного комплексоутворення рП-тмРНК. Дуже важливим було визначення ступеня афінності та специфічності цього протеїну до нуклеїнової кислоти, з якою він зв'язується. З цією метою проведено експеримент, де до проб із досліджуваним білком та міченою [³²P]-тмРНК додавали немічені тмРНК і дріжджову тРНК різного спектра концентрацій, тобто вивчали їхню конкуренцію під час взаємодії. Як видно з рис. 2, В, такий же рівень конкуренції в разі зв'язування з рП зафіксовано для тРНК (за умови її 400-разово більшої концентрації за тмРНК). Все це свідчить про високий ступінь афінності і специфічність тмРНК-зв'язувального протеїну до тмРНК.

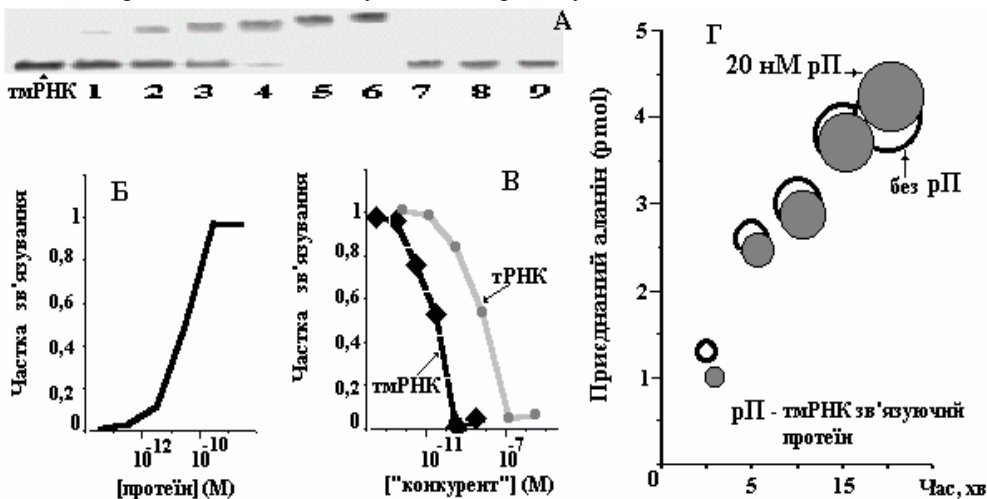


Рис. 2. Властивості рибосомального тмРНК-зв'язувального протеїну (рП): А – виявлення комплексу рП із 0,1 пкМ ³²Р-міченої тмРНК за допомогою детекції зсуву рухливості електрофоретичних смуг у РААГ, де (1–9) – протеїнові проби із відповідних фракцій-елюатів рП після очищення за допомогою препаративного електрофорезу в РААГ за нативних умов; Б – зв'язування рП й тмРНК із даних за пробами 1–6 (А); В – конкуренція за зв'язування рП до 0,1 пкМ ³²Р-міченої тмРНК із неміченими тмРНК і сумарною тРНК із дріжджів; Г – включення *in vitro* аланіну в тмРНК (10 пкмоль) аланіл-тРНК синтетазою за наявності (●) й без (○) рП.

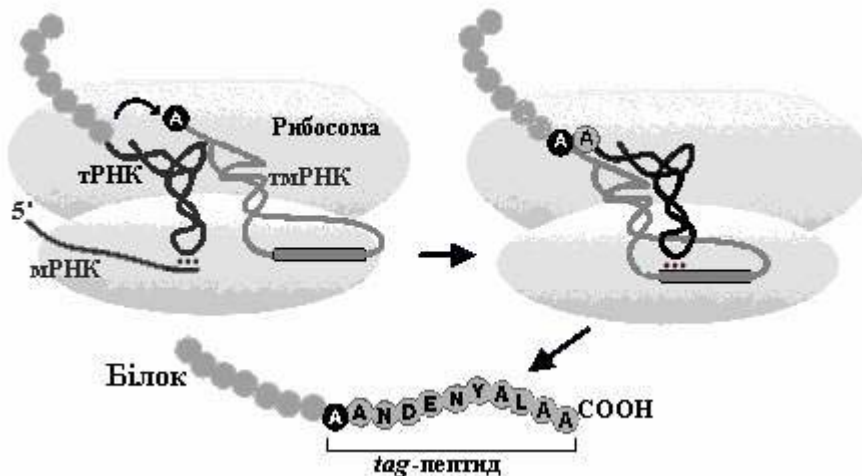


Рис. 3. Гіпотетична модель функціонування тмРНК у *E. coli* (її участь у механізмі деградації “відхилених від норми” протеїнів) та рециркулювання рибосом через транс-трансляцію, адаптовано на підставі [1, 4].

Як відомо із літературних джерел [3, 6, 9], тмРНК може бути аміноацильована аланіл-тРНК синтетазою *in vitro*. Описані вище процеси ілюструє модель на рис. 3. Наявність тмРНК-зв’язувального протеїну не впливала на швидкість аміноацилювання тмРНК Ала-РС, що видно з реакції аміноацилювання за наявності й без рП (за його оптимальних концентрацій для зв’язування, визначених за допомогою “gel-mobility shift assay”; див. рис. 2, Г).

Узагальнення експериментальних даних цієї статті та праць [1, 5] наводить на думку, що тмРНК з дуальною функціональною здатністю тРНК і мРНК бере участь в аміноацилюванні на аміноацилювальному сайті рибосоми, де блокується трансляція дефектної мРНК, у транспептидній реакції (під час якої аланін додається до поліпептидного ланцюга, що зростає), і, зрештою, дає змогу вивільнити заблоковану на рибосомі мРНК та забезпечує трансляцію останніх 10 амінокислот *tag*-пептиду. З усього цього можна зробити висновок, що тмРНК-зв’язувальний білок не потрібний для аміноацилювання, але є необхідним для стабільного зв’язування тмРНК із 70S рибосомою (а саме – з її 30 S субодиноцею; неопубліковані дані).

У разі молекулярних механізмів трансляційних переключень на рибосомах клітини *Escherichia coli* важливу роль відіграють протеїни, які зв’язуються з тмРНК.

Утворення комплексу тмРНК-зв’язувального протеїну із тмРНК дає змогу тмРНК “прикріплюватись” до рибосоми та виконувати свої подвійні функції тРНК і мРНК у транс-трансляційному процесі.

1. Felden B., Himeno H., Muto A. et al. Probing the structure of the *Escherichia coli* 10Sa RNA (tmRNA) // RNA. 1997. Vol. 3. P. 89-104.

2. Hanawa-Suetsugu K., Bordeau V., Himeno H., et al. Importance of the conserved nucleotides around the tRNK-like structure of *Escherichia coli* transfer-messenger RNA for protein tagging // Nucl. Acids Res. 2001. Vol. 29. N 22. P. 4663-4673.
3. Himeno H., Sato M., Tadaki T. et al. In vitro trans-translation mediated by alanine-charged 10SaRNA // J. Mol. Biol. 1997. Vol. 268. P. 803-808.
4. Jentsch S. When proteins receive deadly messages at birth // Science. 1996. Vol. 271. P. 955-956.
5. Keiler K.C., Waller P.R.H., Sauer R.T. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA // Science. 1996. Vol. 271. P. 990-993.
6. Komine Y., Kitabatake M., Yokogawa T. et al. A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 9223-922.
7. Tadaki T., Fukushima M., Ushida C. et al. Interaction of 10Sa RNA with ribosomes in *Escherichia coli* // FEBS Let. 1996. Vol. 399. P. 223-226.
8. Tu G.F., Reid G.E., Zhang J.G. et al. C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with 10Sa RNA decapeptide // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 9322-9326.
9. Ushida C., Himeno H., Watanabe T., Muto A. tRNA-like structures in 10Sa RNAs of *Mycoplasma capricolum* and *Bacillus subtilis* // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 3392-3396.

MOLECULAR MECHANISMS OF TRANSLATION SWITCH ON RIBOSOMES IN A CELL

L. Kalachnyuk

*Biotechnology Research Institute of Animal Productivity
S.Z. Gzhytskyi L'viv National Academy of Veterinary Medicine
Pekarska st. 50, L'viv 79010, Ukraine
e-mail: lilimarg@polynet.lviv.ua*

The tmRNA-binding proteins take important part in molecular mechanisms of translation and translation switch on ribosome in *Escherichia coli* cell. Formation "tmRNA – tmRNA-binding protein complex" emerges conditions for the attachment of tmRNA to ribosome, where this RNA takes its part in trans-translation as tRNA and mRNA.

Key-words: protein biosynthesis, ribosome, tmRNA-binding protein, mRNA, tRNA, tmRNA, trans-translation process, *Escherichia coli*.

Стаття надійшла до редколегії 22.11.2004

Прийнята до друку 19.01.2005