

Еукаріотний фактор елонгації трансляції 1А руйнує агрегати фенілаланіл-тРНК синтетази

Т. О. Лукаш

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

E-mail: LukTan@inbox.ru

Фактор елонгації трансляції 1А забезпечує транспорт і зв'язування відповідної кодон-специфічної аміноацил-тРНК синтетази з аміноацильним сайтом рибосоми. У клітинах ссавців виявлено дві тканинспецифічні ізоформи eEF1A. Показано, що eEF1A1 і eEF1A2 подібно до молекулярних шаперонів, залучених до фолдингу і ренатурації білка, руйнують агрегати фенілаланіл-тРНК синтетази.

Ключові слова: фактор елонгації трансляції 1А, фенілаланіл-тРНК синтетаза, шаперон, агрегація, термоденатурація.

Вступ. Еукаріотний фактор елонгації трансляції eEF1A відіграє важливу роль у процесі білкового синтезу, каталізуючи GTP-залежне зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом рибосоми. eEF1A є частиною комплексу eEF1H, до складу якого входять також eEF1 β γ -субодиниці, які каталізують GTP/GDP обмін у молекулі eEF1A [1]. Фактор елонгації 1А існує в двох ізоформах — eEF1A1 і eEF1A2. Перша форма експресується в більшості тканин, але в процесі розвитку заміщується на другу форму (eEF1A2) в нервовій, серцевій і м'язовій тканинах [2].

Фактор елонгації 1А є одним з найпоширеніших білків у клітині після актину і тубуліну. Цей факт став підставою для пошуку його додаткових функцій. Дійсно, результати досліджень останніх років свідчать про величезну кількість так званих неканонічних функцій фактора елонгації 1А. Серед них є функції, пов'язані з шапероноподібними властивостями eEF1A. Так, eEF1A зв'язує актинові філаменти і мікротрубочки *in vitro* та *in vivo* [3], а також впливає на збирання і ста-

більність полімерів цитоскелета [3, 4]. Це нагадує властивості молекулярних шаперонів, зокрема, їхню здатність контролювати агрегацію мультимерних білків [5]. Є декілька робіт, у яких показано, що прокаріотний фактор елонгації трансляції 1А може зв'язувати та відновлювати денатуровані і некоректно згорнуті білки до їхньої функціонально активної конформації [6, 7], що свідчить про можливу участь EF1A в білковому фолдингу.

Молекулярні шаперони належать до класу поліпептид-зв'язувальних білків, які беруть участь у багатьох процесах у клітині, зокрема у білковому фолдингу *de novo*, в утворенні мультимолекулярних комплексів і деградації незворотно пошкоджених білків [8].

У роботах нашої лабораторії вивчали можливі шапероноподібні властивості фактора елонгації eEF1A з печінки кроля, а саме — досліджували його здатність стабілізувати та відновлювати функціонально активні конформації APCаз [9, 10]. У цьому повідомленні за допомогою методу динамічного світлорозсіювання показано, що дві ізоформи фактора елонгації трансляції (eEF1A1 і eEF1A2) подібно до молекулярних шаперонів руйнують аг-

регати фенілаланіл-тРНК синтетази, які утворюються в процесі термоденатурації.

Матеріали і методи. В роботі використано такі реактиви: АТР, ГТР, фенілаланін («Sigma», США); трис, HEPES («Calbiochem», США); GDP, DTT («Boehringer Mannheim», Німеччина); 2-меркаптоетанол, гліцерин, MgCl₂ («Merck», Німеччина); PMSF («Serva», Німеччина); SP-сефарозу, сефакрил S-400, гепарин-сефарозу («Pharmacia», Швеція); фільтри GF/C, ДЕАЕ-целюлозу («Whatman», Велика Британія); нітроцелюлозні фільтри (діаметр пор 0,45 мкм) («Sartorius-GmbH», Німеччина); гідроксіпатит («Bio-Rad», США); [¹⁴C]фенілаланін (50 Ки/моль, «Amersham», Велика Британія). Інші реактиви вітчизняного виробництва марок «хч» і «осч».

Фенілаланіл-тРНК синтетазу (PheRS) виділяли з печінки кролів відповідно до методики [11], але на останньому етапі очищення тРНК-сефарозу замінено на гепарин-сефарозу.

Активність ферменту визначали на початковій стадії реакції аміноацилювання тРНК. Всю процедуру проводили, як у роботах [11, 12]. Специфічну активність фенілаланіл-тРНК синтетази реєстрували за графіком залежності початкової швидкості реакції аміноацилювання від концентрації ферменту. За одиницю активності брали кількість ферменту, що продукує 1 нмоль Phe-тРНК за 1 хв при температурі 25 °С.

eEF1A1 виділяли з печінки кролів за методикою, розробленою співробітниками нашої лабораторії [13]; eEF1A2 — зі скелетних м'язів кроля. Схема виділення eEF1A2 включала всі етапи очищення, описані в [13], крім гель-фільтрації на сефакрилі S-400.

Активність обох ізоформ фактора елонгації 1A визначали в реакції GDP/[³H]GDP обміну, як описано в [13].

Функцію розподілу молекул PheRS за розмірами вивчали за допомогою термостатованого лазерного кореляційного спектрофотометра «ZetaSizer-3» Malvern Instrument, обладнаного корелятором «multi computing correlator type 7032 ce» та гелій-неоновим лазером ЛГ111, потужністю 25 мВт при довжині хвилі 633 нм.

Експерименти виконували в скляних кюветах діаметром 10 мм. Реєстрацію та статистичну обробку проводили протягом 60—180 с, автокореляційну функцію одержували за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61.

Результати і обговорення. Як показано в попередніх роботах [9, 10], PheRS втрачає свою ферментативну активність в реакції аміноацилювання тРНК після 10 хв інкубації за температури 42 °С. Додавання фактора елонгації 1A до інактивованої синтетази призводило до відновлення її активності в реакції аміноацилювання тРНК, а термоінактивація (42 °С) синтетази в присутності eEF1A спричинювала повне збереження активності ферменту. Таким чином, показано, що еукаріотний фактор елонгації 1A здатний відновлювати активність частково інактивованої PheRS та підтримувати її функціонально активну конформацію за умов теплової денатурації.

PheRS має свої особливості порівняно з іншими аміноацил-тРНК синтетазами. Вона вирізняється здатністю асоціювати з рибосомами, високим значенням ізоелектричної точки ($pI = 8,45$) і складною субодичиною структурою $\alpha\beta_2$ -типу [14]. Слід зауважити, що окремі субодичини ферменту, так само як і димери субодичин, не проявляють ферментативної активності [15].

Для характеристики нативного, денатурованого і ренатурованого станів фенілаланіл-тРНК синтетази у цій роботі обрано метод динамічного світлорозсіювання, який ще називають квазіеластичним світлорозсіюванням або фотон-кореляційною спектроскопією. Це неінвазивний метод детекції молекул у розчині або частинок у суспензії, що дозволяє аналізувати різноманітні динамічні процеси в розчині [16]. Його перевага полягає у можливості застосування при відносно низьких концентраціях білка (0,05—1 мг/мл), а також у присутності гліцерину, що було принциповою умовою для проведення експериментів.

Значення гідродинамічного радіусу R_h одержане для нативної PheRS, збігається з літературними даними. Так, R_h для PheRS людини складає 6,74 нм за температури 20 °С [17], а R_h для PheRS кроля, отримане в наших експериментах, — $6,9 \pm 0,1$ нм (табл. 1).

Для денатурації PheRS препарат ферменту розводили до концентрації 0,05 мг/мл (0,2 мкМ) у буферному розчині, що містив 25 мМ KPO₄, pH 7,5, 25 мМ KCl, 15 %-й гліцерин, 6 мМ 2-меркаптоетанол, та інкубували при температурі 42 °С протягом 0—20 хв.

Теплова денатурація білків часто супроводжується агрегацією денатурованих молекул. Як видно з даних, представлених у табл. 1, кінетика

Таблиця 1

Розподіл молекул фенілаланіл-тРНК синтетази за розмірами в процесі термоденатурації

Концентрація PheRS	R_h				
	0 хв, 42 °C	5 хв, 42 °C	10 хв, 42 °C	15 хв, 42 °C	20 хв, 42 °C
0,2 мкМ	6,9±0,1	3,4±0,08	7,1±0,08	10,2±0,07	10,2±0,1

Таблиця 2

Вплив eEF1A1 і eEF1A2 на розмір денатурованої фенілаланіл-тРНК синтетази

Умови	R_h			
	0 хв, 25 °C	5 хв, 25 °C	10 хв, 25 °C	15 хв, 25 °C
0,2 мкМ PheRS (20 хв, 42 °C) + 10 мкМ eEF1A1	12,4±0,1	12,5±0,06	7,5±0,1	7,5±0,5
0,2 мкМ PheRS (20 хв, 42 °C) + 10 мкМ eEF1A2	12±0,07	12,2±0,05	8±0,08	7,9±0,1

теплової денатурації фенілаланіл-тРНК синтетази має складний характер. У процесі денатурації спочатку відбувається накопичення мономерного білка ($R_h = 3,4 \pm 0,08$, що приблизно відповідає розміру окремих субодиниць ферменту), а через 10 хв — накопичуються агрегати PheRS. Судячи із значення R_h , агрегати можуть складатися з трьох молекул ферменту. Ці дані корелюють з результатами, наведеними в роботі [15], де показано, що саме субодиниці PheRS мають тенденцію до агрегації.

Здатність фактора елонгації 1А відновлювати нативну конформацію денатурованої фенілаланіл-тРНК синтетази було перевірено в серії експериментів, де до денатурованого ферменту додавали різні кількості фактора елонгації і здійснювали преінкубацію за температури 25 °C.

Так, показано, що через 10 хв преінкубації (25 °C) у присутності фактора елонгації як першої, так і другої його ізоформи (молярне співвідношення PheRS/eEF1A = 1/50) значення гідродинамічного радіусу стає близьким до такого для нативного ферменту (табл. 2). Незбіг значень R_h для нативної і ренатурованої PheRS можна пояснити тим, що в процесі дисоціації її агрегатів утворюється комплекс синтетаза-фактор. Якщо згадати, що за таких умов eEF1A відновлює активність PheRS [10], можна зробити висновок про те, що фактор елонгації трансляції подібно до молекулярних шаперонів здатний відновлювати нативну форму фенілаланіл-тРНК синтетази після її термоденатурації.

У клітинах вищих еукаріотів, для яких характерний високий рівень компартменталізації білоксинтезувального апарату, шапероноподібні властивості фактора елонгації трансляції набувають особливого значення. eEF1A може забезпечувати підтримку функціонально активної конформації білоксинтезувальної машини в трансляційних компартментах протягом послідовних циклів елонгації.

Автор висловлює щире подяку В. Ф. Горчеву за кваліфіковану допомогу у проведенні даного дослідження.

T. O. Lukash

Eukaryotic elongation factor 1A disintegrates aggregates of phenylalanyl-tRNA synthetase

Summary

Translation elongation factor 1A (eEF1A) provides binding and transporting of the appropriate codon-specified aminoacyl-tRNA to the aminoacyl site of the ribosome. Two active tissue-specific isoforms of eEF1A have been identified in mammals. Herewith we report that two isoforms of eEF1A disintegrate the aggregates of phenylalanyl-tRNA synthetase like molecular chaperones which are involved in protein folding and renaturation after stress.

Key words: translation elongation factor 1A, phenylalanyl-tRNA synthetase, chaperone, aggregation, thermodenaturation.

T. A. Лукаш

Эукариотный фактор элонгации трансляции 1А разрушает агрегаты фенилаланил-тРНК синтетазы

Резюме

Фактор элонгации трансляции 1А обеспечивает транспорт и связывание соответствующей кодон-специфичной аминокислот-тРНК синтетазы с аминокислотным сайтом рибосомы. В

клетках млекопитающих выявлены две тканеспецифичные изоформы eEF1A. Показано, что eEF1A1 и eEF1A2 подобно молекулярным шаперонам, участвующим в фолдинге и ренатурации белка, разрушают агрегаты фенилаланил-тРНК синтетазы.

Ключевые слова: фактор элонгации трансляции 1A, фенилаланил-тРНК синтетаза, шаперон, агрегация, термоденатурация.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1a: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*—1998.—60.—P. 48—77.
2. Khalifa A., Bourbeau D., Chen E., Petroulakis E., Pan J., Xu S., Wang E. Characterization of elongation factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 protein expression in normal and wasted mice // *J. Biol. Chem.*—2001.—276.—P. 22915—22922.
3. Yang F., Demma M., Warren V., Dharmawardhane S., Condeelis J. Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor-1a // *Nature*.—1990.—347.—С. 494—496.
4. Shiina N., Gotoh Y., Kubomura N., Iwamatsu A., Nishida E. Microtubule severing by elongation factor-1a // *Science*.—1994.—266.—P. 282—285.
5. Hendrick J. P., Hartl F.-U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // *Annu. Rev. Biochem.*—1993.—62.—P. 349—384.
6. Kudlicki W., Coffman A., Kramer G., Hardesty B. Renaturation of rhodanese by translational elongation factor EF-Tu // *J. Biol. Chem.*—1997.—272.—P. 32206—32210.
7. Caldas T. D., Yaagoubi A. E., Richarme G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 11478—11482.
8. Fink A. L. Chaperone-mediated protein folding // *Physiol. Revs.*—1999.—79.—P. 425—449.
9. Лукаш Т. О., Турківська Г. В., Негруцький Б. С., Єльська Г. В. Ренатурація фенілаланіл-тРНК синтетази фактором елонгації eEF1A // *Біополімери і клітина*.—2003.—19, № 4.—С. 350—354.
10. Lukash T. O., Turkivska H. V., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Chaperone-like activity of mammalian elongation factor eEF1A: renaturation of aminoacyl-tRNA synthetases // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*—2004.—36.—P. 1341—1347.
11. Pailiez 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.
12. Овчаренко Г. В., Иванов Л. Л. Методы определения ферментативной активности аминоксил-тРНК синтетаз // *Методы молекуляр. биологии*.—Киев: Наук. думка, 1979.—С. 133—139.
13. Shalak V. F., Budkevich T. V., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. A fast and effective method for purification of elongation factor 1a from rabbit liver // *Укр. биохим. журн.*—1997.—62, № 2.—С. 104—109.
14. Irvin J., Hardesty B. Binding of aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetases to ribosomes from rabbit reticulocytes // *Biochemistry*.—1972.—11.—P. 1915—1920.
15. Бобкова Е. В., Вольфсон А. Д., Анкилова В. Н., Лаврик О. И. Разделение и сравнительная характеристика субъединиц фенилаланил-тРНК синтетаз из *Escherichia coli* MRE-600 и *Thermus thermophilus* HB8 // *Биохимия*.—1990.—55, № 6.—С. 525—533.
16. Дамашун Г., Дамашун Х., Гаст Х., Цирвер Д. Денатурированные состояния дрожжевой фосфолицераткиназы // *Биохимия*.—1998. 3.—63.—P. 308—326.
17. Moor N., Livshiz G., Saftro M. Cloning and expression of human phenylalanyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*: comparative study of purified recombinant enzymes // *Protein Expression and Purification*.—2002.—24.—P. 260—267.

УДК 577.152.611; 577.217.535
Надійшла до редакції 01.12.05