

На правах рукописи

СВЕТЛОВ Максим Сергеевич

**ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СКОРОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ
КОТРАНСЛЯЦИОННОГО СВРАЧИВАНИЯ БЕЛКА**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена в Институте белка РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Колб Вячеслав Адамович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Завильгельский Геннадий Борисович

доктор биологических наук

Кульбачинский Андрей Владимирович

Ведущая организация:

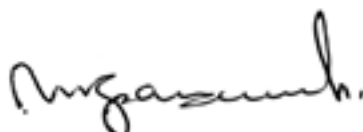
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится 13 ноября 2009 года в 11⁰⁰ часов на заседании совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, лабораторный корпус «А», аудитория 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан 5 октября 2009 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Сворачивание полипептидной цепи в уникальную пространственную структуру белка является одним из ключевых этапов реализации генетической информации, без которого осуществление белком его биологической функции невозможно. Механизм этого процесса и управляющие им законы не выяснены; их изучение остаётся одним из наиболее актуальных и интересных направлений молекулярной биологии.

Установлено, что белки в клетке сворачиваются котрансляционно, в ходе элонгации синтезируемой полипептидной цепи на рибосоме. Котрансляционное сворачивание отличается по ряду физико-химических параметров от сворачивания свободного развёрнутого полипептида в растворе (ренатурации). Так, при котрансляционном сворачивании С-конец растущего полипептида иммобилизован на массивной рибосоме, а длина сворачивающейся цепи не постоянна, а увеличивается с определённой скоростью. Рост цепи происходит векторно, в направлении от N-конца к С-концу. Кроме того вероятно, что растущая полипептидная цепь начинает сворачиваться из «стартовой» α -спиральной конформации, возникающей в пептидилтрансферазном центре рибосомы. Помимо этих факторов, на сворачивание синтезируемых белков могут влиять молекулярные шапероны и другие «катализаторы фолдинга». Роль перечисленных факторов в обеспечении высокой скорости и эффективности котрансляционного сворачивания либо вообще не исследована, либо исследована недостаточно, что и определяет актуальность настоящей работы.

Основные цели и задачи работы. Ранее для ряда белков и, в частности, для люциферазы светлячка *Photinus pyralis*, было показано, что их котрансляционное сворачивание происходит быстро и эффективно (с высоким выходом правильно свёрнутых молекул белка). В то же время сворачивание полностью денатурированной люциферазы в буферном растворе происходит медленно и с низким выходом правильно свёрнутого (ферментативно активного) белка. Ренатурация значительно ускоряется в присутствии молекулярных шаперонов, в частности, белков DnaK, DnaJ и GrpE семейства Hsp70. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, как скорость и эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы зависят от активности шаперонов Hsp70 в системе трансляции, а также определить, как скорость элонгации полипептидной цепи и температура, при которой происходит синтез люциферазы, влияют на эффективность сворачивания этого белка. Кроме того, целью работы было выяснить, ускоряется ли сворачивание денатурированной люциферазы, если её С-конец иммобилизован на массивной частице, как это имеет место при котрансляционном сворачивании. Для достижения поставленных целей решали следующие задачи:

- сравнение значений удельной ферментативной активности люциферазы, синтезированной в бактериальных бесклеточных системах трансляции, отличающихся содержанием активных шаперонов Hsp70;
- определение длительности пост-трансляционной фазы сворачивания люциферазы, синтезируемой в присутствии избытка шаперонов Hsp70;
- измерение удельной ферментативной активности люциферазы, синтезированной в бесклеточной системе трансляции при разной температуре;
- получение бесклеточной системы трансляции, в которой скорость элонгации синтезируемых полипептидов можно изменять, варьируя содержание фактора элонгации G;
- измерение удельной ферментативной активности люциферазы, синтезированной в такой системе при разных скоростях элонгации;
- измерение скорости и эффективности сворачивания денатурированной полноразмерной люциферазы, С-конец которой иммобилизован на массивной частице (грануле хелирующей сефарозы или рибосоме).

Научная новизна и практическая ценность работы. С помощью метода непрерывной регистрации энзиматической активности люциферазы, синтезируемой в бактериальной бесклеточной системе трансляции, было показано, что скорость и эффективность котрансляционного сворачивания этого фермента не зависят от активности молекулярных шаперонов семейства Hsp70 – белков, необходимых для эффективной ренатурации фермента.

Обнаружено, что иммобилизация С-конца денатурированной полноразмерной люциферазы на массивной частице (грануле хелирующего носителя или рибосоме) не ускоряет сворачивания белка по сравнению с ренатурацией свободного белка в растворе. Однако иммобилизация фермента существенно увеличивает эффективность его сворачивания из денатурированного состояния. Выяснено, что высокий выход правильно свёрнутой люциферазы, наблюдаемый при ренатурации этого белка в связанном с носителем состоянии, обусловлен отсутствием межмолекулярной агрегации.

Впервые показано, что эффективность котрансляционного сворачивания белка может зависеть от температуры, при которой происходит трансляция его мРНК. Установлено, что оптимальная температура для продуктивного сворачивания синтезируемой *de novo* люциферазы составляет 25-30°C.

Создана бесклеточная система трансляции, позволяющая варьировать скорость элонгации полипептидной цепи синтезируемого белка. С помощью этой системы показано, что снижение скорости синтеза люциферазы при оптимальной температуре приводит к снижению эффективности её сворачивания.

Основные результаты работы не имеют аналогов в мировой литературе и вносят значительный вклад в представления о закономерностях котрансляционного сворачивания. Полученные данные могут иметь практическое значение для биотехнологии (получение высокоактивных белков) и для медицины (разработка терапевтических подходов в лечении болезней, вызываемых ошибками сворачивания).

Структура диссертации. Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы из 160 ссылок. Работу иллюстрируют 22 рисунков и 2 таблицы.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи. Результаты исследований докладывались на международной конференции в честь А.С. Спирина «Синтез белка» (Пушино, 2001), научной конференции Института белка РАН (Пушино, 2003), XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2005» (Москва, 2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава I. Эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы в бактериальной бесклеточной системе трансляции

Ранее в нашей лаборатории было показано, что светлячковая люцифераза приобретает структуру ферментативно активного белка в процессе её синтеза на рибосоме, то есть котрансляционно. Котрансляционный характер сворачивания белка наблюдали как в эукариотической, так и в прокариотической бесклеточных системах трансляции. Из литературных данных известно, что сворачивание люциферазы светлячка из полностью развёрнутого состояния (ренатурация) происходит медленно и с низкой эффективностью. В первой серии экспериментов сравнивали эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы с эффективностью её спонтанной ренатурации в буферном растворе.

Для синтеза белка использовали бактериальную систему трансляции на основе S30 экстракта клеток *E. coli*. За сворачиванием синтезируемой люциферазы следили с помощью описанного ранее метода непрерывного мониторинга активности фермента в реакционной смеси. Метод основан на том, что субстраты люциферазы, АТФ и люциферин, добавляют в реакционную смесь, а инкубацию смеси при заданной температуре проводят в ячейке люминометра. Трансляцию запускают введением в систему мРНК люциферазы. Метод позволяет детектировать формирование ферментативно активной люциферазы без какой-либо задержки на процедуру измерения активности:

появление активных молекул в растворе регистрируется сразу же по возникающей люминесценции. При этом интенсивность излучения света, пропорциональную количеству активных молекул фермента, можно измерять непрерывно на протяжении всего эксперимента.

Как следует из рис. 1б, в первые 7 минут после начала трансляции активный фермент в реакционной смеси отсутствовал. Затем активность появлялась и нарастала со временем. Появление и нарастание люциферазной активности коррелировало с появлением и увеличением количества полноразмерных молекул фермента в реакционной смеси, что выявляли с помощью ДСН-электрофореза радиоактивно меченных продуктов трансляции (рис. 1а). Таким образом, между появлением в системе трансляции полноразмерного белка и приобретением им пространственной структуры активного фермента нет существенной временной задержки. Это согласуется с ранее полученными в нашей лаборатории данными о том, что синтезированная *de novo* люцифераза завершает сворачивание в течение нескольких секунд (или менее того) после ухода из рибосомы.

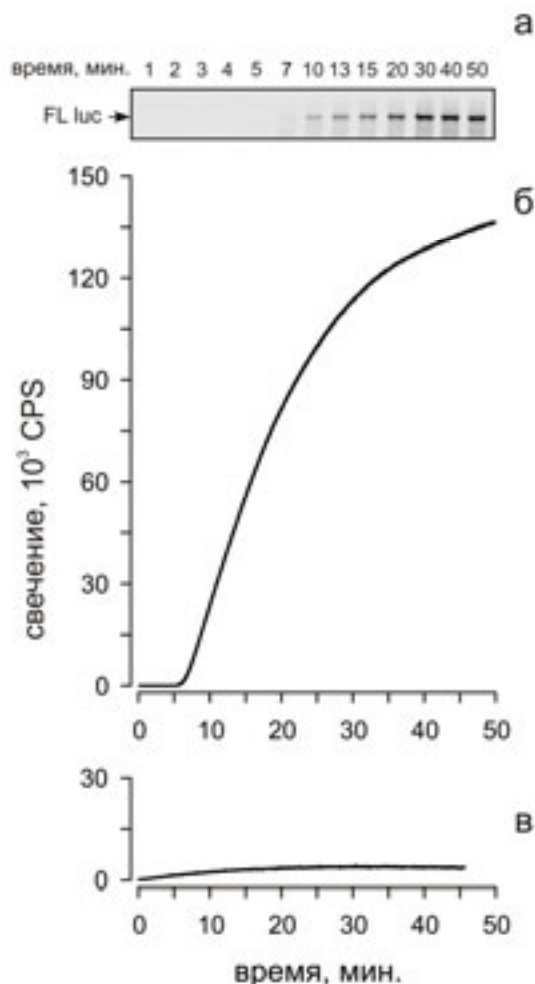


Рис.1 Синтез и сворачивание люциферазы в бактериальной бесклеточной системе трансляции в сравнении со спонтанной ренатурацией денатурированного белка. Синтез белка и его ренатурацию проводили в ячейке люминометра при 25°C в присутствии люциферина. (а) Анализ меченных [¹⁴C]фенилаланином продуктов трансляции мРНК люциферазы с помощью ДСН-электрофореза в 10% полиакриламидном геле и радиоавтографии. Аликвоты для электрофореза отбирали из бесклеточной системы в указанное над дорожками геля время. Положение полосы полноразмерной люциферазы (FL luc) указано стрелкой. (б) Определяемое по люминесценции накопление активной люциферазы в процессе её синтеза в бесклеточной системе трансляции. (в) Определяемое по люминесценции накопление активной люциферазы в процессе её спонтанной ренатурации в буферном растворе. Концентрация белка после разбавления денатуранта составляла 8.4 нМ и соответствовала конечной концентрации фермента, синтезированного в системе трансляции.

Для сравнения эффективности котрансляционного сворачивания люциферазы в системе трансляции и спонтанной ренатурации этого белка из денатурированного состояния в схожих буферных условиях использовали тот

же экспериментальный подход. Люциферазу (коммерческий препарат белка) денатурировали при 20°C в 7.4 М растворе мочевины в течение 5 минут. Рефолдинг инициировали разбавлением пробы буферным раствором, содержащим 0.1 мМ люциферин и имеющим тот же состав, что и система трансляции, но без клеточного экстракта. Конечная концентрация люциферазы после разбавления соответствовала концентрации фермента, синтезированного в бесклеточной системе трансляции, и составляла 8.4 нМ. За восстановлением нативной структуры развёрнутой люциферазы следили по восстановлению её ферментативной активности. На рис. 1в приведена кинетическая кривая восстановления активности люциферазы из состояния беспорядочного клубка. Видно, что, по сравнению со сворачиванием синтезируемого *de novo* белка, ренатурация люциферазы происходит неэффективно.

Глава II. Влияние шаперонов семейства Hsp70 на котрансляционное сворачивание люциферазы

Известно, что для эффективной ренатурации люциферазы необходимы шапероны семейства Hsp70. В литературе было предложено несколько схем, описывающих последовательность участия молекулярных шаперонов (и, в частности, Hsp70) в котрансляционном сворачивании. Гипотезу о важной роли шаперонов Hsp70 в обеспечении высокой эффективности сворачивания, сопряжённого с синтезом белка, следовало проверить. Для этого использовали синтез светлячковой люциферазы в бесклеточных системах трансляции, отличающихся активностью шаперонов Hsp70.

2.1. Активность шаперонов Hsp70 в бактериальной бесклеточной системе трансляции

Для оценки активности шаперонов в бактериальном экстракте, используемом для бесклеточной трансляции, использовали функциональный тест – катализ шаперонами сворачивания денатурированной люциферазы. Денатурацию люциферазы проводили в 7.4 М растворе мочевины как описано выше. Рефолдинг фермента инициировали разбавлением пробы денатурированного белка в бактериальной бесклеточной системе трансляции, в которой присутствовала мРНК GFP (зелёного флюоресцентного белка). Реакционную смесь помещали в термостатируемую при 25°C ячейку люминометра и за ходом восстановления нативной структуры люциферазы следили по восстановлению её ферментативной активности. В качестве контроля использовали разбавление неденатурированного нативного фермента в такой же системе трансляции, содержащей люциферин и мРНК GFP.

Оказалось, что ренатурация люциферазы в системе трансляции происходит с низкой эффективностью: за 60 минут инкубации восстанавливается только 8% от исходной активности (рис. 2). Таким образом, ренатурационный тест

показал, что в исходном экстракте, используемом для трансляции, активные Hsp70 отсутствуют. Для получения системы трансляции с высокой активностью шаперонов использовали коммерческий препарат высокоочищенных бактериальных Hsp70, а именно смесь белков DnaK, DnaJ и GrpE. Их концентрация в системе составляла 1.3 мкМ, 200 нМ и 650 нМ, соответственно, т.е. на порядки превышала концентрацию синтезированного белка. Следует отметить, что добавленные в систему трансляции шапероны не влияли на активность нативной люциферазы (данные не представлены). В то же время, как видно из рис. 2, в присутствии Hsp70 выход активной люциферазы при ренатурации увеличился до 80%.

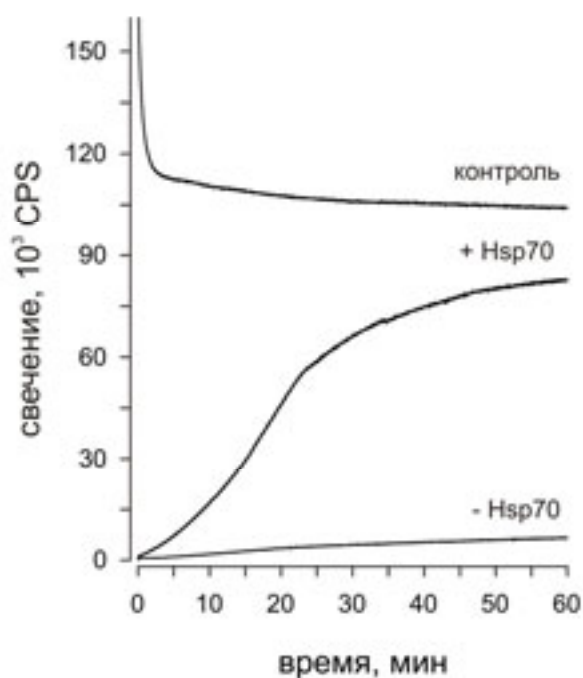


Рис.2 Ренатурация люциферазы в бактериальной бесклеточной системе трансляции.

Ренатурацию люциферазы инициировали 50-кратным разбавлением пробы денатурированного мочевиной белка. Для разбавления использовали бесклеточную систему, транскрибирующую мРНК GFP и содержащую люциферин. Конечная концентрация белка составляла 8.4 нМ. Ренатурацию проводили при 25°C в отсутствие (-Hsp70) или в присутствии добавленных в систему трансляции шаперонов (+Hsp70). В контрольном эксперименте использовали образец люциферазы, не обработанный мочевиной и разбавленный системой трансляции до конечной концентрации 8.4 нМ (контроль).

2.2. Эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы в присутствии шаперонов Hsp70

Влияние шаперонов Hsp70 на эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы оценивали, используя синтез фермента в бактериальных бесклеточных системах трансляции с разным содержанием активных Hsp70. Мерой эффективности сворачивания служила удельная ферментативная активность белка, определяемая как отношение его активности к количеству.

Синтез люциферазы проводили при 25°C в присутствии [14 C]фенилаланина. В случае добавления в систему трансляции высокоочищенных шаперонов DnaK, DnaJ и GrpE (димер), их концентрация составляла 1.3 мкМ, 200 нМ и 650 нМ, соответственно. Активность белка измеряли с помощью люцинометра (рис. 3а).

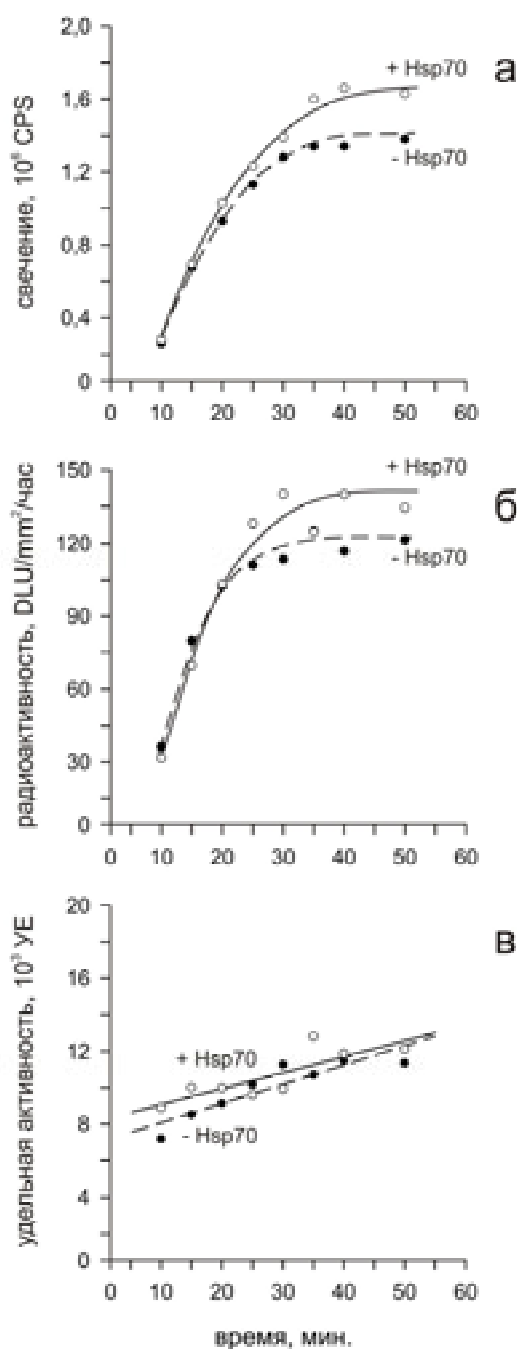


Рис.3 Влияние шаперонов Hsp70 на эффективность сворачивания люциферазы, синтезируемой в бесклеточной системе трансляции.

Люциферазу синтезировали в присутствии [¹⁴C]фенилаланина в системе трансляции без (-Hsp70) или с добавлением шаперонов DnaK, DnaJ и GrpE (+Hsp70) до концентрации 1.3 мкМ, 200 нМ и 650 нМ, соответственно. Аликвоты, отобранные из трансляционной смеси, разбавляли буфером, содержащим АТФ, люциферин и ингибитор белкового синтеза (тиострептон). (а) Активность люциферазы в аликвотах. (б) Количество полноразмерной люциферазы в этих же аликвотах, определённое с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле, радиоавтографии и подсчёта радиоактивности в полосе полноразмерного белка с помощью программы OptiQuant. (в) Удельная ферментативная активность люциферазы в аликвотах, определённая как отношение активности фермента к его количеству.

Образцы после измерения люминесценции подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях, и количество полноразмерного белка оценивали по радиоактивности включившейся в него меченой аминокислоты (рис. 3б). Видно, что количество и активность синтезируемой люциферазы практически не зависят от добавления экзогенных шаперонов. Результат подсчёта удельной активности белка представлен на рис. 3в. Очевидно, что эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы (в отличие от её ренатурации) не зависит от активности шаперонов в системе трансляции.

2.3. Длительность пост-трансляционной фазы сворачивания люциферазы, синтезируемой в присутствии шаперонов Hsp70

Ранее было показано, что синтезируемая *de novo* люцифераза завершает сворачивание и приобретает структуру активного фермента за чрезвычайно короткий промежуток времени (секунды или менее того) после освобождения из рибосомы. Иными словами, пост-трансляционная фаза сворачивания фермента длится не более секунды. В то же время сворачивание денатурированной люциферазы, катализируемое Hsp70 и осуществляющееся в точно таких же условиях (в бесклеточной системе трансляции), происходит медленно, с характеристическим временем в десятки минут (см. рис.2). Можно было ожидать, что в присутствии активных шаперонов Hsp70 сворачивание синтезируемой люциферазы также замедлится, и будет происходить с длительной пост-трансляционной фазой. Для проверки этого предположения трансляцию люциферазной мРНК проводили в присутствии люциферина, непрерывно регистрируя активность синтезируемого фермента. После появления люциферазной активности в реакционную смесь добавляли ингибитор трансляции. Нарастание свечения после остановки синтеза белка было бы возможно лишь вследствие пост-трансляционного сворачивания.

На рис. 4 видно, что введение миноциклина (антибиотика тетрациклинового ряда) в систему трансляции приводило к немедленному прекращению накопления в ней активного фермента. Никакого нарастания свечения вследствие пост-трансляционного сворачивания обнаружено не было ни в системе трансляции с добавленными шаперонами, ни в системе без экзогенных шаперонов, в которой активность Hsp70 практически отсутствует. В контрольном опыте (рис. 4в) добавление буферного раствора вместо ингибитора вызывало лишь незначительное замедление накопления активной люциферазы из-за разбавления смеси. Таким образом, добавление в систему трансляции активных экзогенных Hsp70 не приводит к увеличению длительности пост-трансляционной фазы сворачивания синтезируемого белка, что указывает на неучастие Hsp70 в котрансляционном сворачивании люциферазы.

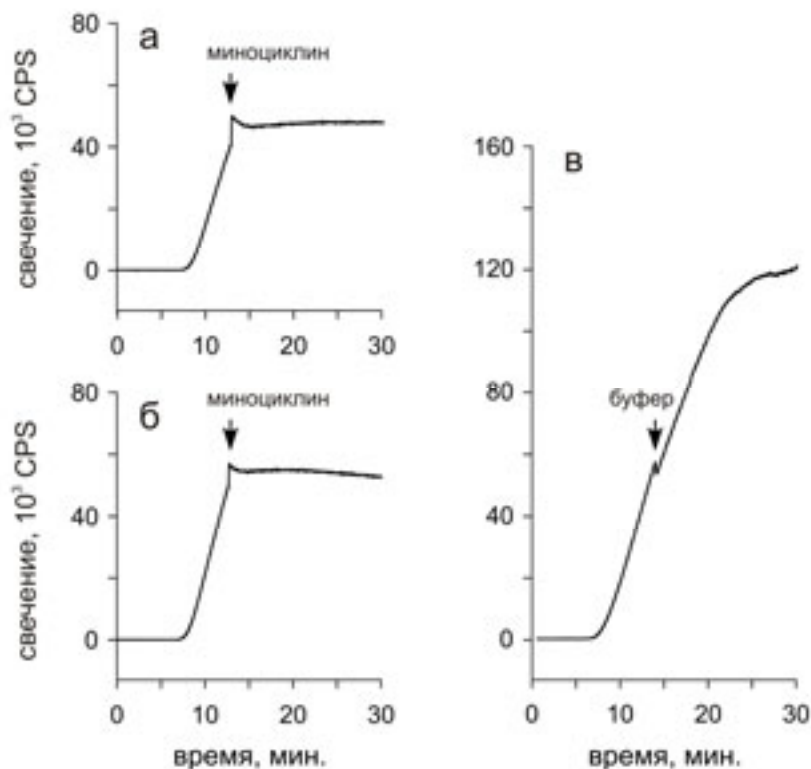


Рис.4 Оценка длительности пост-трансляционной фазы сворачивания люциферазы, синтезируемой в присутствии шаперонов Hsp70. Синтез белка проводили в бесклеточной системе трансляции без добавления шаперонов (а) или с шаперонами, добавленными до концентрации 1.3 мкМ, 200 нМ и 650 нМ, соответственно (б). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. В момент, отмеченный стрелкой, в систему вводили 0.5 мкл раствора миноциклина с концентрацией 5 мМ. (в) В контрольном эксперименте в систему добавляли 0.5 мкл буферного раствора.

Глава III. Сворачивание люциферазы с иммобилизованным на массивной частице С концом

Наблюдаемые различия между котрансляционным сворачиванием и ренатурацией люциферазы в скорости и эффективности этих процессов должны определяться физико-химическими факторами. Например, при ренатурации развёрнутого полноразмерного белка оба конца его цепи подвижны и не закреплены, в то время как С конец синтезируемого полипептида закреплён на рибосоме, масса которой на порядки превышает массу растущей полипептидной цепи. Для проверки предположения о том, что иммобилизация С конца полипептида может служить причиной его быстрого и эффективного сворачивания из развёрнутого состояния, использовали два подхода. Первый заключался в иммобилизации С конца люциферазы на гранулах хроматографического носителя, второй – в использовании природных комплексов рибосомы с растущим полипептидом, связанным с рибосомой в виде пептидил-тРНК.

3.1. Сворачивание полипептидной цепи люциферазы, иммобилизованной на гранулах сефарозы

Иммобилизацию С конца полипептидной цепи на массивной частице проводили, используя высокое сродство олигогистидинового тракта к ионами никеля, связанным на поверхности гранул хелирующей сефарозы. Для получения люциферазы, содержащей С-концевой гексагистидиновый тракт, к 3' концу люциферазного гена была добавлена нуклеотидная последовательность, кодирующая дополнительный 22-членный пептид, оканчивающийся шестью гистидиновыми остатками. Такой ген экспрессировали в клетках *E. coli* и синтезированный активный фермент выделяли из клеток и очищали с помощью металл-хелатной хроматографии.

Связанный с никелевой сефарозой белок денатурировали в буферном растворе 7 М мочевины при 25°C в течение 5 минут. Для инициации сворачивания образец при той же температуре разбавляли буферным раствором без денатуранта, содержащим АТФ и люциферин. Конечная концентрация люциферазы составляла 8 нМ. За ренатурацией следили по восстановлению светоизлучающей активности в реакционной смеси, помещённой в ячейку люминометра.

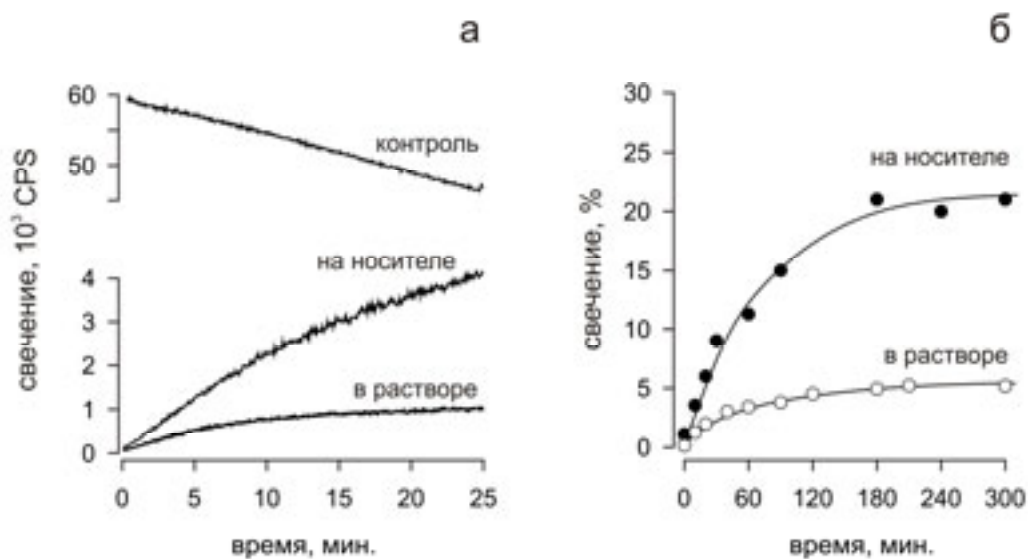


Рис.5 Сворачивание денатурированной люциферазы, иммобилизованной на гранулах Ni²⁺-сефарозы (**на носителе**) и свободно диффундирующей **в растворе**. (а) Непрерывная регистрация люминесценции ренатурирующей люциферазы. Контролем служило разбавление неденатурированной люциферазы буферным раствором с АТФ и люциферин. (б) Измерение активности фермента в аликвотах, отобранных из реакционной смеси в указанное время. За 100% принята активность неденатурированной люциферазы.

Оказалось, что иммобилизация С конца белка не ускоряет его ренатурации: уровень плато не был достигнут за 25 минут инкубации (рис. 5а). В то же время иммобилизованный на носителе белок сворачивался с существенно большим выходом, чем белок, ренатурирующий в свободном виде в растворе.

Измерение активности фермента в аликвотах, отобранных из реакционной смеси, позволило определить выход активного белка в процессе ренатурации. На рис. 5б видно, что приблизительно 20% иммобилизованных на носителе молекул белка восстанавливает свою активность. В то же время плато выхода ренатурации свободного белка в растворе достигает значения всего в 5%. При этом характеристическое время восстановления половины от максимально достижимой активности составляет 50 минут как для ренатурации фермента в растворе, так и на носителе. Можно заключить, что иммобилизация С конца люциферазы на гранулах сефарозы увеличивает эффективность ренатурации, но не влияет на скорость этого процесса.

Причина низкой продуктивности ренатурации люциферазы в растворе может заключаться либо в неправильном сворачивании отдельных молекул белка, либо в их агрегации. В отличие от первой, вторая реакция зависит от концентрации белка. В следующей серии опытов ренатурацию проводили при разной концентрации люциферазы, составлявшей после разбавления денатуранта 0.33, 1.6, 8, 32 и 160 нМ. Результат опыта представлен на рис. 6. Видно, что эффективность ренатурации люциферазы в растворе снижается при увеличении концентрации белка.

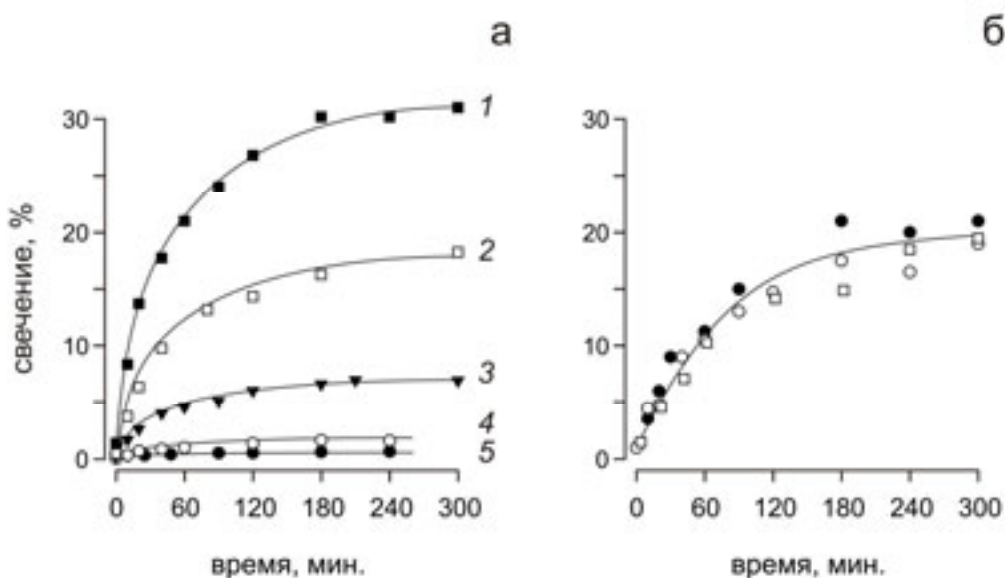


Рис.6 Ренатурация находящейся в растворе (а) и иммобилизованной (б) полипептидной цепи люциферазы при разной концентрации белка. Концентрация люциферазы составляла 0.33 (1, ■), 1.6 (2, □), 8 (3, ▼), 32 (4, ○) и 160 (5, ●) нМ.

Так, при концентрации 0.33 нМ выход активного фермента составляет 30%, а при 160 нМ – всего лишь 0.5% (рис. 6а, кривые 1 и 5). Очевидно, что основной причиной низкого выхода активной люциферазы при ренатурации в растворе является её межмолекулярная агрегация. Такой же опыт был проведён с белком, иммобилизованным на гранулах сефарозы (рис. 6б). Видно, что в отличие от ренатурации в растворе, эффективность ренатурации полипептидных цепей, связанных с носителем, не зависит от концентрации фермента и составляет при всех использованных концентрациях белка примерно 20%. Следовательно, можно заключить, что иммобилизация белка на носителе исключает его агрегацию и, тем самым, способствует его эффективному сворачиванию.

3.2. Ренатурация люциферазы, иммобилизованной на рибосоме в виде пептидил-тРНК

Для получения рибосом, содержащих пептидил-тРНК с пептидом заданной длины, применяли "останавливающую" последовательность белка SecM. Эту последовательность составляют аминокислотные остатки со 150 по 166. Известно, что после синтеза этого 17-членного участка полипептидной цепи рибосомой трансляция останавливается и дальнейшего удлинения полипептида не происходит. При этом синтезированная полипептидная цепь остаётся прочно связанной с рибосомой в виде пептидил-тРНК, находящейся в Р-участке.

Для получения люциферазы, иммобилизованной на 70S рибосоме, к 3' концу кодирующей части люциферазного гена была добавлена последовательность, кодирующая 13-членный спейсерный участок и "останавливающий" фрагмент SecM длиной в 17 аминокислотных остатков (рис. 7а). Поскольку связанной с рибосомой люциферазе необходимо не менее 26 дополнительных С-концевых аминокислотных остатков для сворачивания в энзиматически активный белок, наличие спейсера было необходимо для проявления активности "остановленной" люциферазы. Кроме этого, на 5' конец гена люциферазы поместили последовательность, кодирующую гексагистидиновый тракт.

Ген модифицированной люциферазы, находящийся под контролем T7-промотора, вводили в клетки *E. coli* штамма BL21(DE3). Образовавшиеся в результате его экспрессии комплексы рибосомы с энзиматически активной люциферазой выделяли из клеток и подвергали хроматографической очистке на хелирующем носителе. На рис. 7б представлен результат электрофоретического анализа белкового состава комплексов. Видно, что кроме полос рибосомных белков, на геле присутствует дополнительная полоса с электрофоретической подвижностью, соответствующей подвижности белка с массой в ~100 кДа. Это значение соответствует ожидаемой молекулярной массе люциферазной пептидил-тРНК. При обработке комплексов пурамицином (антибиотиком, реагирующим с пептидил-тРНК в Р-участке и вызывающим освобождение полипептида из рибосомы) изменяется электрофоретическая подвижность только этого компонента комплексов. После пурамициновой реакции

подвижность уменьшается до значения, соответствующего белку с молекулярной массой в ~70 кДа, т.е. модифицированной люциферазе. Это доказывает, что люцифераза была связана с рибосомой в виде пептидил-тРНК, находящейся в Р-участке.

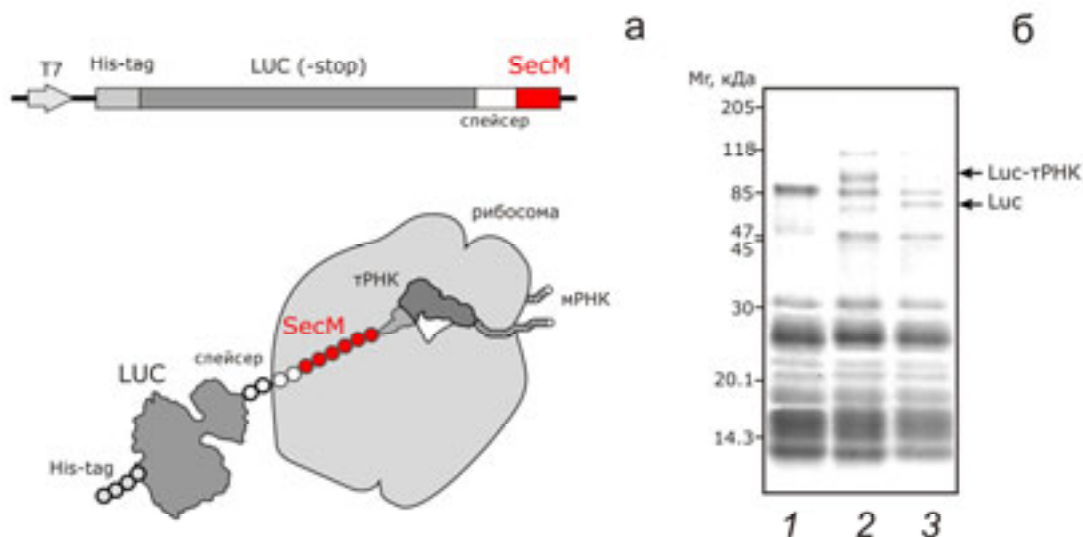


Рис.7 Получение люциферазы, связанной с рибосомой в виде пептидил-тРНК. (а) Вверху: схема ДНК-матрицы, кодирующей модифицированную люциферазу. Ген белка находится под контролем T7-промотора (T7), последовательность люциферазы не содержит терминирующего кодона (LUC(-stop)). Дополнительные последовательности кодируют N-концевой гексагистидиновый тракт (His-tag) и C-концевой "останавливающий" фрагмент белка SecM (SecM), соединённый с люциферазой 13-членным пептидом (спейсер). Внизу: схема комплекса рибосомы и люциферазной пептидил-тРНК, образующейся при экспрессии гена модифицированной люциферазы. (б) Электрофоретический анализ белкового состава рибосомных комплексов, содержащих люциферазную пептидил-тРНК. Анализовали вакантные рибосомы *E. coli* (1), комплексы, полученные после хроматографической очистки на хелирующей сефарозе (2) и такие же комплексы после реакции с 2 мМ пурамицином (3). Представлена фотография геля, окрашенного кумасси голубым. Положение маркеров молекулярной массы и величины их масс указаны слева от электрофореграммы. Положение люциферазной пептидил-тРНК и люциферазы указано стрелками справа.

Для изучения ренатурации белка, связанного с рибосомой, нельзя применять денатурацию в концентрированном растворе мочевины, поскольку это приведёт к разворачиванию рибосомы и разрушению её комплекса с пептидил-тРНК. Известно, что люцифераза светлячка является термолабильным белком, инактивирующимся при повышенной температуре. Термоинактивацию применили для денатурации люциферазы, связанной с рибосомой. Предварительно нами было установлено, что после 20 минут инкубации при 40°C люцифераза полностью теряла активность, но оставалась связанной с рибосомой в виде пептидил-тРНК, чувствительной к пурамицину.

Для инициации сворачивания люциферазы, денатурированной нагреванием при 40°C, образец возвращали к нормальной температуре в 25°C. За ходом ренатурации следили по восстановлению светоизлучающей активности фермента. В качестве контроля использовали белок, который не подвергался тепловой инактивации.

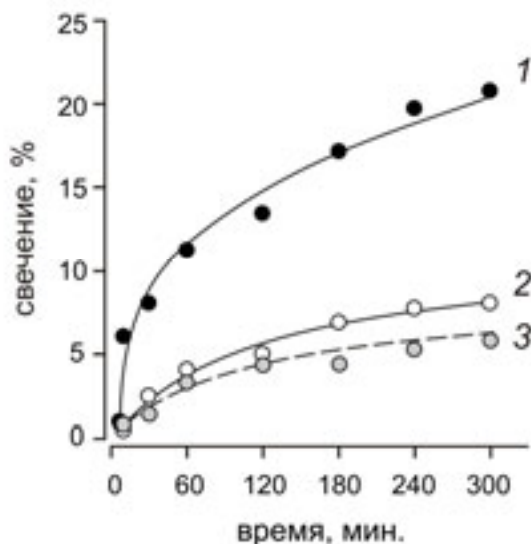


Рис.8 Ренатурация люциферазы, денатурированной нагреванием. Связанную с рибосомой в виде пептидил-тРНК (1) или освобожденную из рибосомы в раствор в ходе пурамициновой реакции (2) люциферазу денатурировали в буферном растворе при 40°C в течение 20 минут. В таких же условиях денатурировали белок дикого типа (3). Для инициации сворачивания температуру реакционной смеси понижали до 25°C. Концентрация фермента составляла 8 нМ во всех опытах. Активность неденатурированного фермента принята за 100%.

Ренатурация термически денатурированной люциферазы происходила медленно: уровень плато не был достигнут в течение 5 часов инкубации ни в случае белка, связанного с рибосомой в виде пептидил-тРНК, ни в случае свободного белка, сворачивающегося в растворе (рис. 8, кривые 1 и 3). В то же время связанная с рибосомой люцифераза сворачивалась с большей эффективностью, чем фермент дикого типа в растворе: после 5 часов инкубации выход активного белка составил 20% и 6%, соответственно. Очевидно, что это различие вызвано исключительно иммобилизацией фермента на рибосоме, поскольку его освобождение в раствор с помощью пурамициновой реакции снижает эффективность ренатурации белка с 20 до 8% (рис. 8, кривая 2). Таким образом можно заключить, что иммобилизация С конца люциферазы на рибосоме (так же, как и на гранулах сефарозы) увеличивает эффективность её сворачивания из денатурированного состояния, но не обеспечивает высокой скорости этого процесса, наблюдаемой при котрансляционном сворачивании.

Глава IV. Влияние скорости синтеза полипептидной цепи люциферазы на её котрансляционное сворачивание

При котрансляционном сворачивании синтез белка сопряжён по времени с формированием его третичной структуры. Можно ожидать, что скорость синтеза полипептидной цепи влияет на сопряжённое с ним сворачивание.

Чтобы проверить это предположение, было использовано два способа варьирования скорости синтеза люциферазы в бесклеточной системе трансляции. Первый заключался в синтезе фермента в обычном экстракте при разной температуре, второй основывался на использовании для синтеза специального экстракта, в котором можно варьировать концентрацию фактора элонгации G (EF-G) и, тем самым, менять скорость элонгации полипептидной цепи. Оба подхода были использованы для выявления зависимости эффективности котрансляционного сворачивания люциферазы от скорости её синтеза на рибосоме.

4.1. Влияние температуры на эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы

Известно, что скорость химических реакций (как спонтанных, так и катализируемых ферментами) зависит от температуры. Процесс биосинтеза белка состоит из ряда реакций, и также должен зависеть от температуры. Для выявления вида этой зависимости мРНК люциферазы транслировали в бактериальной бесклеточной системе при 16, 20, 25, 30, 35 и 40°C. Скорость синтеза фермента оценивали по времени появления люминесценции в реакционной смеси, поскольку в начале инкубации активный фермент отсутствует в транслирующей системе. Как следует из рис. 9, увеличение температуры инкубации приводит к более быстрому появлению активной люциферазы в системе. Так, люциферазная реакция наблюдается уже после 2 минут инкубации при 40°C, в то время как при 16°C – только после 20 минут. При всех значениях температуры инкубации, опробованных в опыте, появление люциферазной активности коррелирует по времени с появлением полноразмерных молекул фермента в трансляционной системе (рис. 9, радиоавтографы гелей ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле). Можно заключить, что скорость синтеза полипептидной цепи возрастает с увеличением температуры.

Чтобы установить, зависит ли эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы от температуры, при которой происходит её синтез, определяли удельную активность фермента, синтезированного при разной температуре. Удельную активность белка подсчитывали как отношение ферментативной активности люциферазы, измеренной при 25°C, к количеству полноразмерного меченого белка (рис. 10). Видно, что зависимость эффективности котрансляционного сворачивания белка от температуры, при которой происходит его синтез, имеет "колоколообразный" вид. Самые большие значения удельной активности люциферазы наблюдаются в интервале температур от 25 до 30°C, а самые низкие – при 16°C и 40°C.

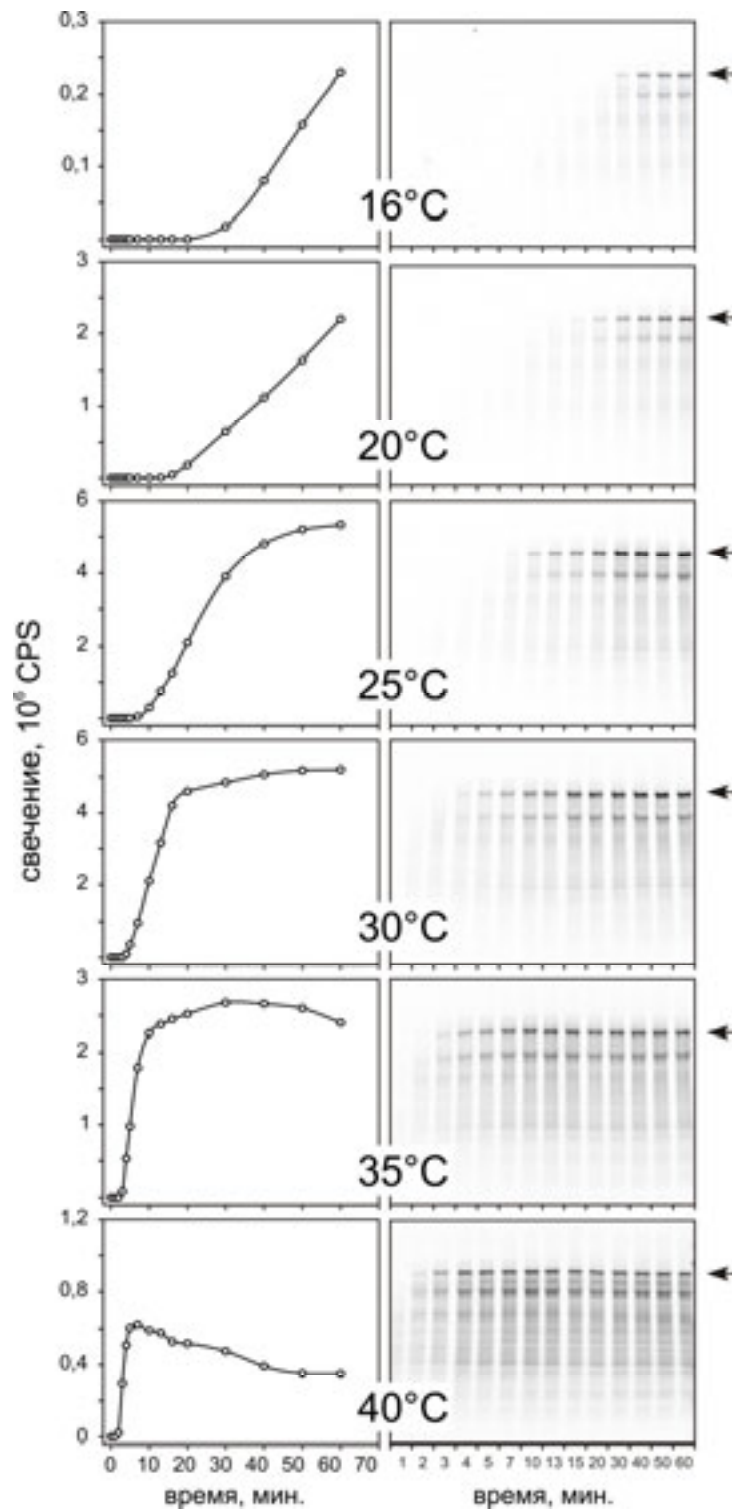


Рис.9 Бесклеточный синтез люциферазы при разной температуре. Синтез белка проводили в присутствии [¹⁴C]лейцина при указанной температуре. Аликвоты отбирали из транскрибирующих систем в указанное под радиоавтографом время и разбавляли их буферным раствором, содержащим АТФ, люциферин и тиострептон. Активность люциферазы в аликвотах измеряли с помощью люцинометра при 25°C (графики представлены слева). Радиоактивно меченые продукты трансляции в аликвотах анализировали с помощью ДСН-электрофореза в 10% полиакриламидном геле и радиоавтографии (радиоавтографы представлены справа). Положение полосы полноразмерной люциферазы указано стрелкой.

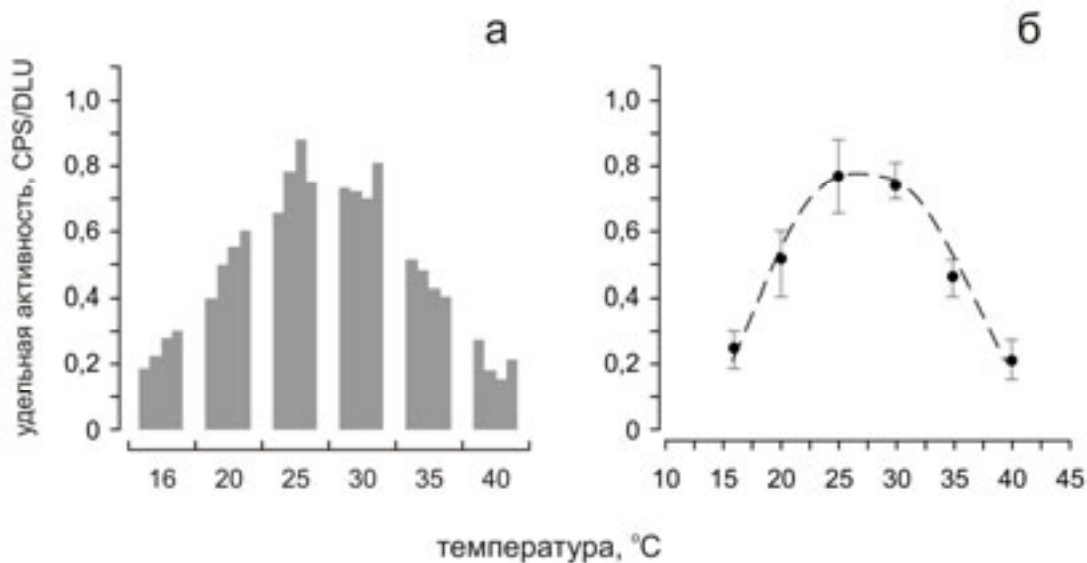


Рис.10 Зависимость удельной активности люциферазы от температуры, при которой происходил синтез фермента. (а) удельная активность люциферазы, синтезированной при определённой температуре (указана на оси абсцисс, под соответствующей группой слитых столбцов). Отдельный столбец в группе (в порядке слева направо) представляет величину удельной активности, измеренной на 30, 40, 50 и 60 минутах трансляции, соответственно. (б) Усреднённая по времени синтеза удельная активность в зависимости от температуры, при которой синтезировали фермент.

4.2. Влияние скорости синтеза люциферазы на эффективность её котрансляционного сворачивания

Зависимость эффективности котрансляционного сворачивания люциферазы от температуры может быть объяснена не только влиянием скорости синтеза полипептидной цепи на её сворачивание. Как было показано выше, люцифераза является термолабильным белком. Поэтому низкая удельная активность фермента, синтезируемого при высокой температуре, может быть обусловлена его тепловой денатурацией. Низкие же температуры должны приводить к снижению гибкости полипептидной цепи и замедлению её сворачивания, что также может сказаться на удельной активности люциферазы.

Для того чтобы установить, зависит ли эффективность котрансляционного сворачивания именно от скорости синтеза белка, была разработана бесклеточная система трансляции, в которой скорость элонгации полипептидной цепи можно варьировать при постоянной температуре. Скорость элонгации зависит от многих факторов, и, в частности, от активности фактора элонгации G (EF-G), белка, катализирующего рибосомную транслокацию. В группе М.Г. Бубуненко (National Cancer Institute, USA) для нас был создан штамм NB5 *E. coli*, в котором ген EF-G удалён из хромосомы одновременно с введением в клетки плазмиды, содержащей ген мутантного фактора. Последовательность мутантного белка снабжена С-концевым

гексагистиридиновым трактом, что позволяло избирательно удалять фактор из клеточного экстракта. Ожидалось, что снижение концентрации EF-G в системе трансляции должно замедлить элонгацию полипептидной цепи.

Для удаления фактора G из S30 экстракта клеток штамма NB5 использовали металл-хелатную хроматографию на Ni²⁺-сефарозе. Связанный с носителем белок элюировали буферным раствором, содержащим 0.5 М имидазол. Элюат, а также не связавшийся с носителем тотальный белок экстракта, анализировали с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 11). Видно, что обработка Ni²⁺-сефарозой вызывает обеднение экстракта по единственному белку, электрофоретическая подвижность которого соответствует подвижности EF-G (молекулярный вес 80 кДа). В то же время обработка хелирующей сефарозой экстракта клеток штамма A19, содержащих EF-G дикого типа, не приводила к удалению белков из экстракта (рис. 11).

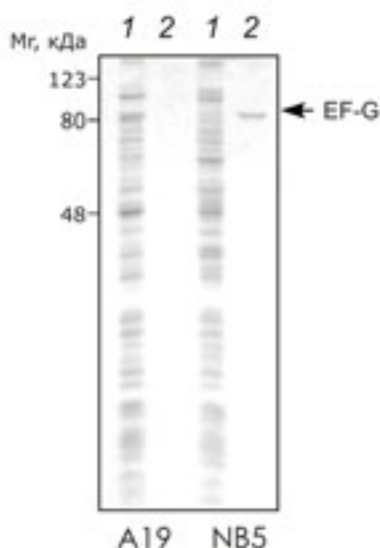


Рис.11 Белковый состав S30 экстрактов, подвергнутых металл-хелатной хроматографии. Экстракт клеток *E. coli* штамма NB5 или A19 инкубировали в присутствии Ni²⁺-сефарозы, носитель отделяли центрифугированием и связанный белок элюировали буферным раствором, содержащим 0.5 М имидазол. Аликвоты экстракта после обработки (1), и элюата (2) анализировали с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле. Приведена фотография геля, окрашенного кумасси голубым. Положение полосы полноразмерного EF-G указано стрелкой. Положение маркеров молекулярной массы и величины их масс указаны слева от электрофореграммы.

В S30 экстракте клеток NB5, обеднённом по EF-G, транслировали мРНК люциферазы. Синтез белка вели при 25°C в присутствии субстратов люциферазы, непрерывно измеряя интенсивность свечения в реакционной смеси. Видно, что обеднение экстракта по фактору G существенно снижает скорость синтеза белка (рис. 12). Время, необходимое для появления активных молекул люциферазы, при этом увеличивается с 6 минут в исходном экстракте (содержащем EF-G в исходной концентрации) до 30 минут в экстракте, обеднённом по EF-G. Также следует отметить, что в обработанном Ni²⁺-сефарозой экстракте количество синтезируемого активного фермента снижено.

Для проверки предположения, что замедление трансляции связано именно со снижением концентрации EF-G, синтез люциферазы проводили, добавляя в обеднённый экстракт высокоочищенный препарат фактора. Как видно на рис.

12, добавление в систему трансляции очищенного EF-G увеличивает скорость синтеза и количество синтезированной активной люциферазы. Так, добавление в экстракт EF-G до концентрации 1 мкМ и 10 мкМ уменьшает время, необходимое для появления люциферазной активности в системе трансляции, с 30 минут до 12 и 7 минут, соответственно. Можно заключить, что наблюдаемое замедление синтеза белка в экстракте, обработанном Ni²⁺-сефарозой, обусловлено снижением концентрации только EF-G. В дополнительных экспериментах было показано, что снижение концентрации EF-G не изменяет скорости других стадий трансляции – инициации и терминации (данные не приведены). Таким образом, именно замедление элонгации вызывает снижение скорости синтеза белка.

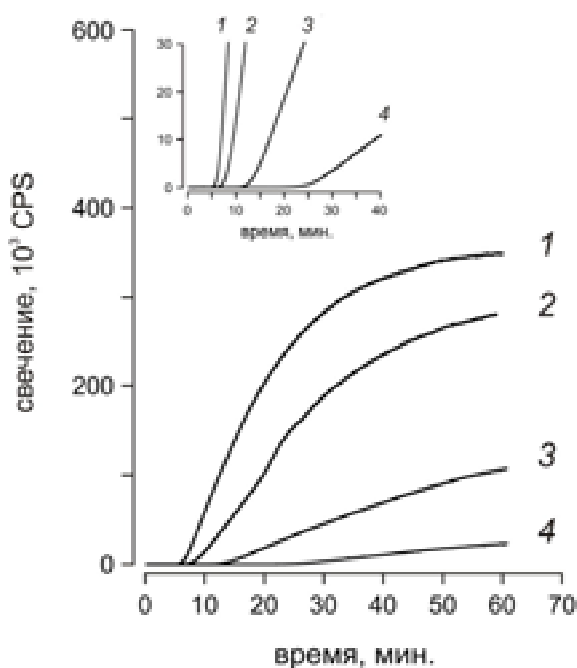


Рис.12 Синтез люциферазы в бесклеточной системе трансляции при разных концентрациях EF-G.

Синтез белка проводили при 25°C в системе трансляции, содержащей необработанный S30 экстракт клеток NB5 (1), экстракт, обеднённый по EF-G с помощью Ni²⁺-хелатной хроматографии (4), или обеднённый экстракт, к которому был добавлен очищенный EF-G до концентрации 1 мкМ (3) и 10 мкМ (2). На врезке вверху представлен фрагмент того же графика в увеличенном масштабе.

Далее была измерена удельная активность люциферазы, синтезированной с разными скоростями. Синтез вели при температуре 30°C в присутствии [¹⁴C]лейцина. В заданное время из системы трансляции отбирали аликвоты. Активность фермента и радиоактивность, включившуюся в его полноразмерную цепь, измеряли, как описано выше (главы 2.2 и 4.1). Оказалось, что замедление синтеза белка вызывало снижение эффективности сворачивания синтезируемого фермента (рис. 13). Увеличение скорости синтеза с помощью добавления к обеднённому экстракту фактора элонгации приводило к восстановлению удельной активности люциферазы до уровня, наблюдаемого в необработанном экстракте.

На рис. 13б представлена зависимость удельной активности белка от скорости его синтеза. Скорость, выраженную в аминокислотных остатках в секунду, рассчитывали как отношение количества аминокислотных остатков в люциферазной цепи ко времени, необходимому для её синтеза. Видно, что максимальное снижение концентрации EF-G, достигнутое в опыте, приводит к

2-кратному снижению удельной активности синтезируемого белка. Таким образом, выявлена зависимость эффективности котрансляционного сворачивания белка от скорости элонгации его полипептидной цепи. В случае люциферазы снижение скорости приводит к ухудшению сворачивания. Вероятно, этой же причиной обусловлено снижение удельной активности люциферазы, синтезируемой при низкой температуре.

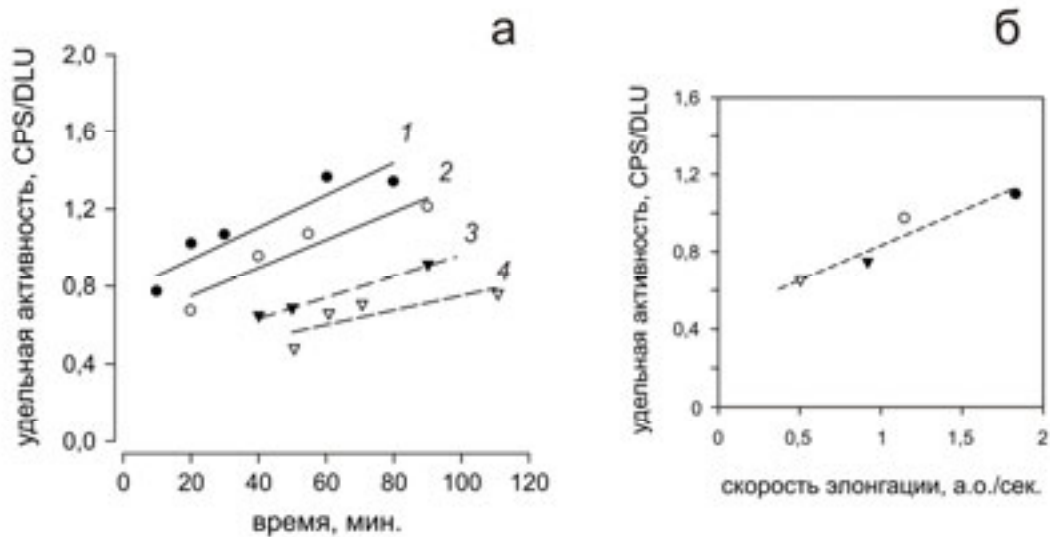


Рис 13 Удельная активность люциферазы, синтезируемой в бесклеточных системах трансляции с разными концентрациями EF-G. **(а)** Удельная активность фермента, измеренная в процессе работы системы в указанное время. Системы трансляции содержат исходный экстракт клеток NB5 (**1**), экстракт, обеднённый по EF-G с помощью Ni^{2+} -сефарозы (**4**) или обеднённый экстракт, к которому добавлен EF-G до концентрации 1 мкМ (**3**) и 10 мкМ (**2**). Синтез фермента проводили при 30°C. **(б)** Зависимость усреднённой по времени удельной активности люциферазы от скорости элонгации (в аминокислотных остатках в секунду).

ВЫВОДЫ

1. Молекулярные шапероны семейства Hsp70, необходимые для эффективного сворачивания денатурированной люциферазы светлячка *Photinus pyralis*, не участвуют в котрансляционном сворачивании этого белка.
2. Иммобилизация С конца люциферазы на массивной частице (гранула сефарозы или рибосома) увеличивает эффективность сворачивания этого белка из денатурированного состояния, препятствуя межмолекулярной агрегации.
3. Иммобилизации С конца растущего полипептида на рибосоме недостаточно для обеспечения высокой скорости котрансляционного сворачивания.
4. Эффективность котрансляционного сворачивания люциферазы зависит от температуры: её оптимальное значение лежит между 25 и 30°C.
5. Эффективность котрансляционного сворачивания зависит от скорости элонгации полипептидной цепи на рибосоме. В случае люциферазы замедление элонгации приводит к снижению удельной активности синтезированного фермента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Светлов М.С., Колб В.А., Коммер А. и Спирин А.С. (2005) Эффективное котрансляционное сворачивание светлячковой люциферазы не зависит от шаперонов Hsp70. *Тезисы докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2005», Москва, 12 – 15 апреля.*
2. Svetlov M.S., Kommer A., Kolb V.A. and Spirin A.S. (2006) Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family. *Protein Sci.*, **15**, 242-247.
3. Светлов М.С., Колб В.А. и Спирин А.С. (2007) Сворачивание полипептидной цепи светлячковой люциферазы с иммобилизованным С-концом. *Мол. биология*, **41**, 96-102