

УДК 577.213

НЕГИДРОЛИЗУЕМЫЙ АНАЛОГ АТФ – 5'-АДЕНИЛИЛ-ИМИДОДИФОСФАТ (АМФ-РНР) – НЕ ИНГИБИРУЕТ АТФ-ЗАВИСИМОЕ СКАНИРОВАНИЕ ЛИДЕРНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ мРНК*

© 2015 П.А. Сахаров, А.С. Соколов, С.Ч. Агаларов**

*Институт белка РАН, 142290 Пушкино Московской обл.,
ул. Институтская, 4; факс: +7(499)514-0218,
электронная почта: sultan@vega.protres.ru*

Поступила в редакцию 14.06.14
После доработки 22.07.14

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы ответить на вопрос: возможно ли использование негидролиземого аналога АТФ – АМФ-РНР – в качестве ингибитора АТФ-зависимого сканирования лидерной последовательности эукариотической мРНК в исследованиях инициации трансляции. Проведено исследование образования рибосомных 48S инициаторных комплексов на стартовом кодоне копированной мРНК с лидерной последовательностью β-глобиновой мРНК кролика. Исследование проводилось в системе, состоящей из индивидуальных компонентов инициации трансляции. Получены зависимости эффективности образования 48S инициаторных комплексов от концентрации АТФ и времени инкубации в отсутствие и в присутствии АМФ-РНР. Показано, что во всех исследованных случаях АМФ-РНР никак не влияет на эффективность образования 48S инициаторных комплексов. Сделан вывод, что нерасщепляемый аналог АТФ – АМФ-РНР – не является ингибитором инициации трансляции у эукариот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инициация трансляции, рибосомный 48S инициаторный комплекс, АМФ-РНР, туп-ринтинг.

Инициация трансляции является важнейшим этапом биосинтеза белка у эукариот: именно на этой стадии трансляции действуют основные механизмы регуляции белкового синтеза в клетке. Согласно классическому механизму инициации (сканирующая модель Козак [1]) рибосомная 40S субъединица в комплексе с белковыми факторами инициации связывается с кэп-структурой на 5'-конце лидерной последовательности мРНК и начинает АТФ-зависимое движение (сканирование) в направлении от 5'-конца к 3'-концу вдоль цепи мРНК до достижения инициаторного кодона. Однонаправленность этого движения недавно была доказана экспериментально [2]. Несколько ранее была предложена диффузионно-храповиковая модель, согласно которой энергия гидролиза АТФ обеспечивает однонаправленное движение путем пе-

риодических изменений аффинности фактора инициации трансляции eIF4A, связанного с рибосомной 40S частицей, к РНК-связывающему белку eIF4B и к мРНК, в результате чего ограничивается движение 43S инициаторного комплекса назад и разрешается стохастическое (диффузионное) движение вперед вдоль цепи мРНК [3]. Фактор инициации eIF4A представляет собой РНК-зависимую АТФазу, катализирующую гидролиз АТФ с образованием АДФ и ортофосфата [4]. Следовательно, если модель верна, то такой аналог АТФ, как 5'-аденилил-имидодифосфат (АМФ-РНР), у которого гидролизуемая АТФазой пирофосфатная связь между β- и γ-фосфатами заменена на негидролизуемую, казалось бы, должен ингибировать энергозависимое однонаправленное движение инициаторного 43S комплекса вдоль цепи мРНК и, соответственно, формирование 48S инициаторного комплекса на стартовом кодоне. В литературе, однако, имеются данные, согласно которым катализируемый фактором eIF4A гидролиз АТФ не ингибируется в присутствии АМФ-РНР [5].

Для проверки возможности ингибирования однонаправленного сканирования лидерной последовательности эукариотической мРНК с

Принятые сокращения: АМФ-РНР – 5'-аденилил-имидодифосфат, негидролизуемый аналог АТФ; СХР – карбокси-Х-родамин; н. – нуклеотид.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-167, 28.12.2014.

** Адресат для корреспонденции.

помощью нерасщепляемого аналога АТР (АМР-РНР) и дальнейшего использования этого реагента в исследованиях инициации трансляции мы использовали метод ингибирования удлинения праймера (так называемый «тупринтинг») [6] в модификации, разработанной в нашей лаборатории [7]. В качестве сканируемой лидерной последовательности мРНК была использована хорошо изученная лидерная последовательность глобиновой мРНК. Мы определили эффективность образования 48S инициаторного комплекса в зависимости от концентрации АТР и времени инкубации как в отсутствие, так и в присутствии АМР-РНР. Удивительно, но во всех случаях (в оптимальных и субоптимальных условиях) использование негидролизующего аналога АТР — АМР-РНР — не приводило к ингибированию образования 48S инициаторного комплекса на стартовом кодоне.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Компоненты системы сборки инициаторных 48S комплексов. Природные и рекомбинантные факторы инициации трансляции, рибосомные субъединицы и природная мРНК β -глобина кролика были получены, как описано ранее [7].

Проверка качества препарата АМР-РНР. В работе был использован препарат АМР-РНР компании «Sigma», США. Т.к. этот реагент являлся ключевым в данном исследовании, были проведены тесты на его качество. Получен масс-спектр АМР-РНР, который выявил полное соответствие измеренной молекулярной массы препарата его химическому составу. Кроме того, проведена реакция окисления люциферина люциферазой в присутствии АМР-РНР (эта реакция идет в присутствии АТР, причем гидролизует его α - β -связь). АМР-РНР оказался также реакционноспособен в этом тесте, поэтому был сделан вывод, что у данного препарата негидролизующая связь находится в β - γ -положении, что соответствует химической формуле АМР-РНР.

Формирование рибосомных инициаторных комплексов. Сборку инициаторных 48S комплексов проводили следующим образом: 0,5 пмоль мРНК добавляли к охлажденной на льду смеси, состоявшей из 4 пмоль 40S рибосомных субъединиц, 5 пмоль eIF2, 3 пмоль eIF3, 3 пмоль eIF4F, 15 пмоль eIF1, 15 пмоль eIF1A, 3 пмоль eIF4A, 10 пмоль eIF4B и 1 пмоль Met-tRNA_i в буфере, содержащем 40 мМ Tris-ОAc (рН 7,5), 3,7 мМ Mg(OAc)₂, 2 мМ DTT, 0,25 мМ спермидин, 0,2 мМ GMP-РНР, 0,1 мМ ЭДТА, 120 мМ KCl, 0,3 ед/мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock RNase Inhibitor («Fermentas», Литва).

Смесь также содержала АТР и, где это необходимо, АМР-РНР (концентрации указаны в тексте и подписях к рисункам). Реакционную смесь объемом 20 мкл инкубировали при 37° в течение 1, 2, 5 или 15 мин.

Ингибирование удлинения праймера (тупринтинг). Концентрацию Mg²⁺ в смеси с преформированными инициаторными комплексами доводили до 7 мМ. Это вызывало остановку реакции, т.к. при такой концентрации ионов магния формирование комплексов не происходит. Для проведения реакции удлинения праймера к смеси добавляли по 0,5 мМ dАТР, dСТР, dGТР и dТТР, 2 пмоль/мкл ДНК-праймера с флуоресцентной меткой и 0,3 ед/мкл обратной транскриптазы AMV RT («Promega», США). Реакционную смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин. Продукты обратной транскрипции очищали экстракцией фенолом, осаждали 70%-ным этанолом и 0,7 М NH₄ОAc и растворяли в 20 мкл 90%-ного формамида на ТВЕ-буфере. В каждый образец для капиллярного электрофореза добавляли аликвоты (0,5 мкл) флуоресцентно-меченных стандартов длин ДНК (карбокси-Х-родамин — CXR, 60–400 н.; «Promega», США). Нуклеотидная последовательность ДНК-праймера для отжига на мРНК: 5'-[6-карбоксифлуоресцеин]-GGACTCGAAGAACCTCTG-3'.

Капиллярный электрофорез продуктов реакции удлинения праймера. Фрагменты кДНК, образовавшиеся в результате реакции удлинения праймера, анализировали с помощью капиллярного гель-электрофореза на приборе ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Собранные данные обрабатывали, используя программное обеспечение GeneMarker 1.5 (Soft-Genetics). Профили распределения флуоресценции кДНК были соотнесены с последовательностью мРНК с использованием флуоресцентно-меченных стандартов длин ДНК (CXR, 60–400 н.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже упоминалось выше, согласно классической модели рибосомная 40S субъединица в комплексе с белковыми факторами инициации (43S инициаторный комплекс) сканирует цепь мРНК в направлении 5'–3' до достижения инициаторного кодона. На инициаторном кодоне AUG рибосомный комплекс фиксируется, формируя так называемый 48S инициаторный комплекс. Таким образом, по эффективности формирования этого 48S комплекса на инициа-

торном кодоне можно судить об эффективности процесса сканирования. Для определения эффективности образования рибосомного 48S инициаторного комплекса обычно используют метод ингибирования удлинения праймера, или тупринтинг [6]. В настоящей работе мы использовали модификацию этого метода, в которой 5'-конец праймера был помечен флуоресцентной меткой; анализ флуоресцентных продуктов проводили с помощью капиллярного электрофореза с оптической регистрацией образцов [7].

Поскольку ранее зависимость выхода 48S инициаторных комплексов от концентрации АТФ не оценивалась, мы сначала провели соответствующие эксперименты, результаты которых показаны на рис. 1. На рис. 1, *а* представлены электрофореграммы, демонстрирующие формирование 48S инициаторных комплексов на мРНК в широком диапазоне концентраций АТФ. Характерный «трезубец» на правой стороне электрофореграмм указывает на позицию 48S рибосомного комплекса на инициаторном кодоне AUG, а интенсивность пиков трезубца отражает количество инициаторных рибосомных комплексов, достигших инициаторного кодона в результате сканирования. Рис. 1, *б* демонстри-

рует зависимость выхода 48S инициаторных комплексов от концентрации АТФ, из которой видно, что полунасыщение субстратом наступает при концентрации $\sim 0,01$ мМ и достигает максимума при концентрации АТФ 0,05 мМ. Мы решили проверить влияние AMP-PNP на формирование 48S инициаторных комплексов в диапазоне концентраций АТФ 0–0,05 мМ, т.е. в наиболее чувствительных точках, исходя из зависимости на рис. 1, *б*. На рис. 2 изображены электрофореграммы, показывающие выход 48S инициаторных комплексов в присутствии 2 мМ AMP-PNP и разных концентрациях АТФ. Видно, что, несмотря на столь преобладающий избыток AMP-PNP по сравнению с АТФ, эффективность образования 48S инициаторных комплексов не меняется и остается на том же уровне, что и в отсутствие AMP-PNP (ср. рис. 1, *а* и рис. 2). Следовательно, в исследованных условиях AMP-PNP никак не влияет на формирование 48S инициаторных комплексов.

Однако оставалась возможность, что AMP-PNP может каким-то образом замедлять процесс формирования 48S комплексов. Иными словами, выбранное время инкубации (15 мин) достаточно велико, и эффект возможного влия-

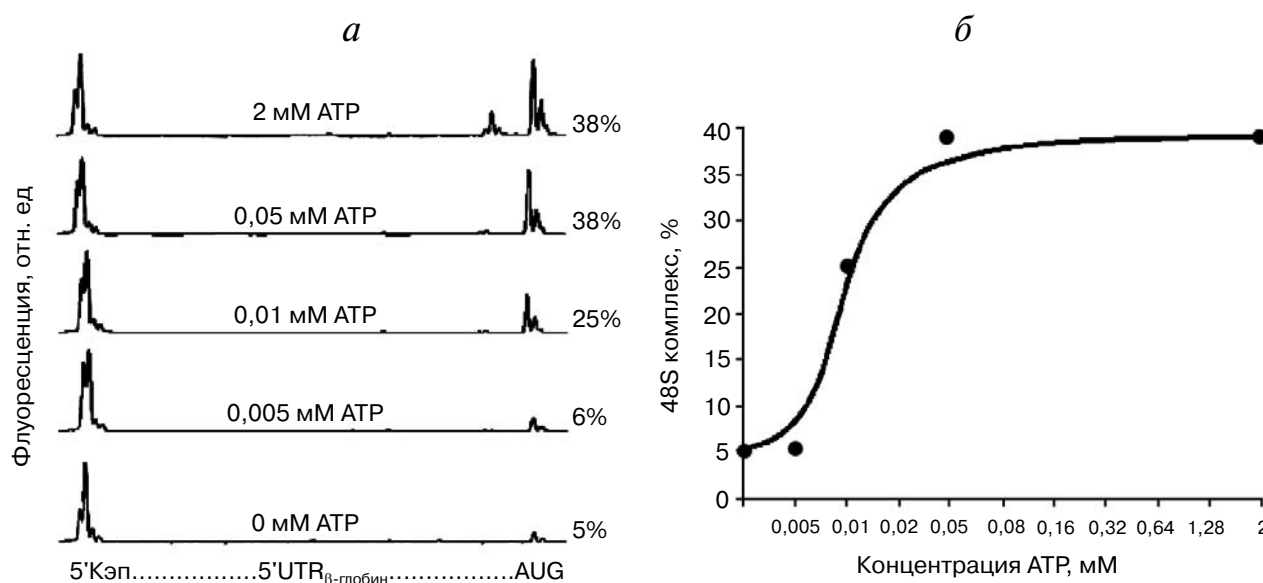


Рис. 1. Формирование инициаторных 48S рибосомных комплексов на стартовом кодоне природной экпированной β -глобиновой мРНК при различных концентрациях АТФ. *а* – Электрофореграммы, отражающие формирование 48S комплексов на инициаторном кодоне AUG. Относительная флуоресценция продуктов кДНК, генерированных в результате реакции обратной транскрипции, соотнесена на графике с последовательностью глобинового лидера. Суммарная флуоресценция основных пиков слева отражает количество полноразмерного продукта, когда мРНК прочитывается до 5'-конца без остановки. Суммарная флуоресценция трех пиков (трезубец), расположенных справа, соответствует продукту обратной транскрипции, остановленной 48S рибосомным комплексом, образовавшимся на инициаторном кодоне AUG. Справа указан процент выхода инициаторных комплексов, рассчитанный из интенсивности флуоресценции пиков, соответствующих 48S комплексу, отнесенной к общей флуоресценции всех продуктов кДНК, образовавшихся на мРНК; *б* – график зависимости выхода 48S комплекса от концентрации АТФ по результатам рис. 1, *а*

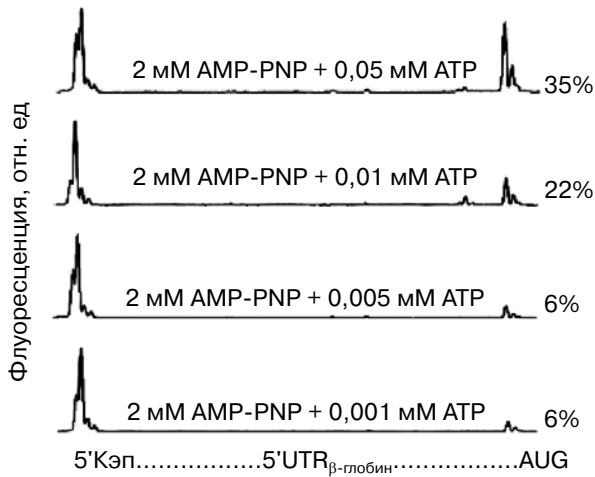


Рис. 2. Формирование инициаторных 48S рибосомных комплексов в присутствии 2 мМ AMP-PNP и разных концентрациях АТФ (детали – в подписи к рис. 1, а)

ния AMP-PNP может сказываться при существенно более коротких временах реакции. В литературе нет данных, показывающих зависимость формирования рибосомных 48S комплексов от времени. Соответствующие эксперименты были проведены нами (рис. 3). Оказалось, что хотя хорошо детектируемое количество 48S инициаторных комплексов появляется уже после 1 мин инкубации, выход комплексов существенно зависит от времени, но совершенно не зависит от присутствия в реакционной смеси преобладающего количества AMP-PNP.

Все наши данные убедительно показывают, что AMP-PNP не является ингибитором АТФ-зависимого сканирования лидерной последовательности мРНК. Известно, что связывание фактора инициации eIF4A с мРНК является АТФ-зависимым [8]. В обзоре Роджерса с соавт. [4] со ссылкой на ту же работу Абрамсона с соавт. [8] отмечается, что eIF4A не связывается с

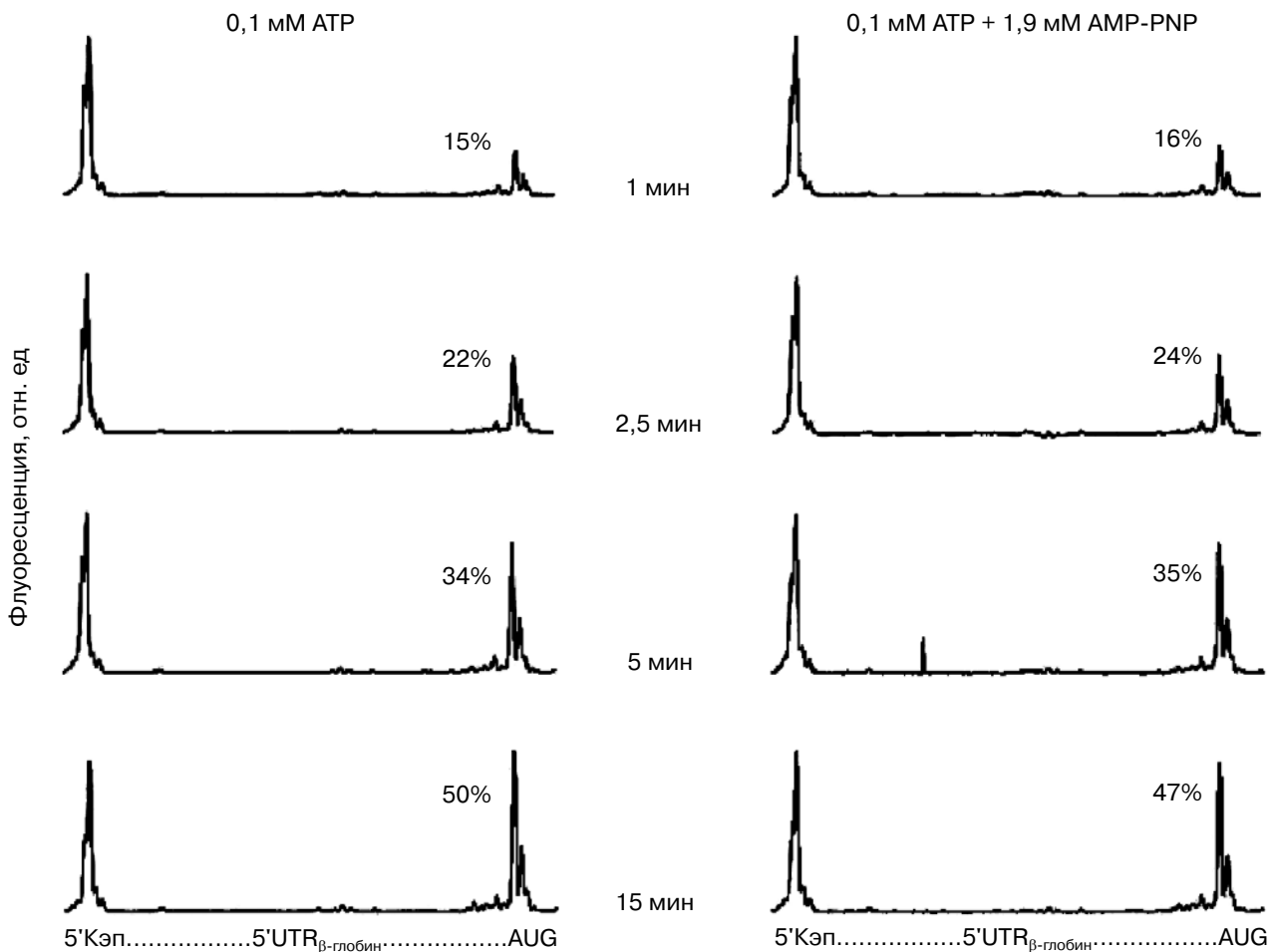


Рис. 3. Зависимость формирования инициаторных 48S рибосомных комплексов от времени в присутствии 0,1 мМ АТФ (левая панель) и 0,1 мМ АТФ + 1,9 мМ AMP-PNP (правая панель). Детали – в подписи к рис. 1, а

мРНК, если АТР заменен на его негидролизуемый аналог – АМР-РNP. К сожалению, нам так и не удалось найти экспериментальное подтверждение этого в цитированной работе [8]. Однако это утверждение согласуется с другим наблюдением, согласно которому катализируемый фактором eIF4A гидролиз АТР не ингибируется в присутствии АМР-РNP [5]. Совсем недавно опубликована работа, в которой авторы показали, что АМР-РNP не способствует переходу eIF4A в активную конформацию, по-видимому, просто не связываясь с ним [9]. Следует отметить, что в нашей работе АМР-РNP использовался не на уровне парциальных реакций, а в полной системе сборки инициаторных комплексов, тем самым строго показано отсутствие его влияния на инициацию в целом. Следовательно, нерасщепляемый аналог АТР – АМР-РNP – нельзя использовать в качестве ингибитора в экспериментах по изучению инициации трансляции у эукариот.

В заключение следует добавить, что наши данные ставят под сомнение вывод, сделанный в

работе Копеиной с соавт. [10] об АТР-независимом характере реинициации трансляции на полирибосомах. Для доказательства такой точки зрения авторы этой работы использовали АМР-РNP, считая этот реагент ингибитором АТР-зависимой РНК-хеликазы eIF4A, который, как теперь понятно, таковым не является. В свете новых данных вопрос о механизме реинициации трансляции на полирибосомах остается открытым и требует дальнейших экспериментов.

Авторы выражают благодарность А.С. Спирина за поддержку и постоянный интерес к работе, критические замечания и полезные советы, а также К.С. Василенко, В.А. Колбу и Е.А. Согорину за обсуждение результатов и А.К. Сурина за проведение масс-спектрометрических экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 12-04-01179-а и 13-04-40213-Н) и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozak, M. (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA, *Cell*, **15**, 1109–1123.
2. Vassilenko, K.S., Alekhina, O.M., Dmitriev, S.E., Shatsky, I.N., and Spirin, A.S. (2011) Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5555–5567.
3. Spirin, A.S. (2009) How does a scanning ribosomal particle move along the 5'-untranslated region of eukaryotic mRNA? Brownian Ratchet model, *Biochemistry*, **48**, 10688–10692.
4. Rogers, G.W. Jr., Komar, A.A., and Merrick, W.C. (2002) eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **72**, 307–331.
5. Bi, X., Ren, J., and Goss, D.J. (2000) Wheat germ translation initiation factor eIF4B affects eIF4A and eIFiso4F helicase activity by increasing the ATP binding affinity of eIF4A, *Biochemistry*, **39**, 5758–5765.
6. Hartz, D., McPheeters, D.S., Traut, R., and Gold, L. (1988) Extension inhibition analysis of translation initiation complexes, *Methods Enzymol.*, **164**, 419–425.
7. Shirokikh, N.E., and Spirin, A.S. (2008) Poly(A) leader of eukaryotic mRNA bypasses the dependence of translation on initiation factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2105**, 10738–10743.
8. Abramson, R.D., Dever, T.E., Lawson, T.G., Ray, B.K., Thach, R.E., and Merrick, W.C. (1987) The ATP-dependent interaction of eukaryotic initiation factors with mRNA, *J. Biol. Chem.*, **262**, 3826–3832.
9. Harms, U., Andreou, Z.A., Gubaev, A., and Klostermeier, D. (2014) eIF4B, eIF4G and RNA regulate eIF4A activity in translation initiation by modulating the eIF4A conformational cycle, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7911–7922.
10. Kopeina, G.S., Afonina, Z.A., Gromova, K.V., Shirokov, V.A., Vasiliev, V.D., and Spirin, A.S. (2008) Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2476–2478.

**NONHYDROLYZABLE ATP ANALOG
5'-ADENYLYL-IMIDODIPHOSPHATE (AMP-PNP)
DOES NOT INHIBIT ATP-DEPENDENT SCANNING
OF THE LEADER SEQUENCE OF THE mRNA**

P. A. Sakharov, A. S. Sokolov, S. Ch. Agalarov*

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 4, Pushchino 142290, Moscow region, Russia;
fax: +7(495)514-0218, E-mail: sultan@vega.protres.ru*

Received June 14, 2014

Revision received July 22, 2014

The goal of the present work was to determine whether it is possible to use a nonhydrolyzable analog of ATP (AMP-PNP) as an inhibitor of ATP-dependent scanning of the leader sequence of eukaryotic mRNA translation initiation. The formation of the ribosomal 48S initiation complexes on the start codon of the capped mRNA leader sequence of rabbit beta-globin mRNA was studied. The study was carried out in a system composed of individual components of translational initiation. The dependences of the efficiency of the 48S initiation complexes to form on the ATP concentration and incubation time were obtained in the absence and presence of AMP-PNP. It was found that in all the cases studied AMP-PNP does not affect the efficiency of the formation of the 48S initiation complexes. We conclude that the non-cleavable analog of ATP, AMP-PNP, is not an inhibitor of translation initiation in eukaryotes.

Key words: translation initiation, 48S ribosomal initiation complex, AMP-PNP, toeprinting