

УДК 577.213

ФОРМИРОВАНИЕ НОВЫХ ПОЛИСОМ НА СВОБОДНЫХ мРНК В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ ТРАНСЛЯЦИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ЧАСТИЧНОЙ РАЗБОРКОЙ РАНЕЕ СФОРМИРОВАННЫХ ПОЛИСОМ*

© 2015 Е.А. Согорин, С.Ч. Агаларов, А.С. Спиринов**

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

Поступила в редакцию 06.05.15

Разработан метод детекции флуоресцентно-меченной мРНК в транслирующих рибосомных комплексах. Показано, что в работающей бесклеточной системе трансляции с уже сформированными полисомами происходит формирование новых полисом на свободной мРНК. Впервые показано, что этот процесс сопровождается частичной разборкой ранее сформированных полисом. Этот результат интерпретируется как указание на прямую связь механизма терминации трансляции полисомных рибосом с аппаратом инициации трансляции свободных мРНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эукариотические полирибосомы, мРНК, бесклеточная система трансляции, флуоресценция.

Синтез белков (трансляция) в живых клетках и бесклеточных системах осуществляется рибосомами, которые организованы в крупные ассоциаты с матричной РНК (мРНК) таким образом, что одну цепь мРНК одновременно транслируют, двигаясь по цепи друг за другом, несколько или даже много рибосом. Структура, в которой мРНК ассоциирована со многими транслирующими рибосомами, получила название **полирибосомы**, или **полисомы**.

Создание бесклеточных систем трансляции с продолжительным временем жизни, таких как СЕСФ (бесклеточная система с непрерывным обменом, [1]), позволило начать систематическое исследование структурной организации полирибосом и их конформационных изменений в течение многих последовательных раундов трансляции [2]. Удобными для этой цели оказались бесклеточные системы на основе экстракта из зародышей пшеницы [3, 4], т.к. они не содержат эндогенных мРНК, что позволяет следить за формированием и структурными превращениями полисом, образованных на добавленной мРНК. Было установлено, что в течение многочасовой работы системы полисомы, формируемые с первых минут трансляции, увеличиваются

в размерах за счет вовлечения в них новых рибосом и одновременно претерпевают ряд последовательных конформационных превращений («онтогенез полисом») [2].

В настоящей работе был поставлен вопрос, способны ли образовываться новые полирибосомы на свободных (вакантных) мРНК в уже работающей системе трансляции с ранее сформированными полирибосомами. Для этой цели мы метили флуоресцентной меткой 3'-конец свободных мРНК, и эту флуоресцентно-меченную мРНК добавляли в уже работающую систему трансляции на разных стадиях синтеза белка. Таким образом, вновь образованные полирибосомы должны быть флуоресцентно-мечеными и, следовательно, легко распознаваться при анализе полирибосомного профиля после центрифугирования трансляционной смеси в градиенте концентрации сахарозы.

Эксперимент показал, что вновь добавленная мРНК вовлекается в образование новых полирибосом на разных стадиях трансляции. При этом неожиданным оказалось то, что одновременно с образованием новых полирибосом на вновь добавленной мРНК прежде сформированные полирибосомы уменьшались в размерах, т.е. происходила их частичная разборка. Этот результат интерпретируется как указание на прямую связь механизма терминации трансляции полисомных рибосом с аппаратом инициации трансляции свободных мРНК.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-139, 23.08.2015.

** Адресат для корреспонденции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Транскрипция мРНК и ее модификация флуоресцентной меткой. Во всех экспериментах в качестве мРНК использовалась гибридная полирибонуклеотидная последовательность, составленная из следующих трех частей: 1) 5'-нетранслируемая область РНК вируса табачной мозаики (ТМВ), обозначаемая также как «omega РНК»); 2) кодирующая часть мРНК (1650 нуклеотидов) люциферазы американского светлячка; 3) 3'-нетранслируемая область РНК вируса табачной мозаики (ТМВ). В целом конструкция обозначается как «5'UTR_{omega}-Luc-3'UTR_{TMV}»; ДНК-конструкция для получения этой мРНК (*pTZ10omegaLUC*) путем транскрипции описана ранее [5]. Транскрипцию *in vitro* проводили по методу, описанному в работе Покровской и Гуревича [6], с небольшими изменениями: смесь для транскрипционной реакции содержала 400 мМ Tris (рН 7,5, доводили уксусной кислотой), 50 мМ KCl, 111 мМ Mg(OAc)₂, 100 мМ ДТТ, 100 мМ β-меркаптоэтанол, 10 мМ спермидин, 0,05%-ный Тритон-Х100, 1 мМ ЭДТА, 4 мМ каждого нуклеозидтрифосфата (АТР, ГТР, УТР, СТР), 15 нг/мкл плазмиды, линейаризованной эндонуклеазой рестрикции Bsp120I, 0,5 ед/мкл ингибитора РНКаз «RiboLock RNase inhibitor» и 5 ед/мкл T7 РНК-полимеразы («Fermentas», Литва). Реакцию проводили при 37° в течение 2 ч. Далее смесь подвергали обработке кислым фенолом (1/1, по объему), водную фазу отбирали и добавляли NaOAc (рН 5,5) до 300 мМ и 3 объема этанола. мРНК собирали центрифугированием при 14 100 г в течение 15 мин, высушивали и растворяли в деионизованной воде. Данный раствор очищали от нуклеотидов осаждением 3,5 М LiCl (30 мин при 4°). Осадок растворяли в деионизованной воде и дважды переосаждали этанолом в присутствии 2 М NH₄OAc (в первый раз) и 300 мМ NaOAc, рН 5,5 (во второй раз). Осадок промывали 80%-ным этанолом и растворяли в воде.

мРНК модифицировали по 3'-концу следующим образом: 300 мкг мРНК инкубировали 50 мин во льду в 5 мМ растворе NaJO₄ и 100 мМ NaOAc (рН 5,5). После инкубации к реакционной смеси добавляли NaOAc (рН 5,5) до 300 мМ и 3 объема этанола. Далее окисленную по 3'-концу мРНК инкубировали в течение 4,5 ч во льду в 7 мМ растворе флуоресцеин-5-тиосемикарбазида («Invitrogen», США; стоковый раствор в DMSO) и 100 мМ NaOAc (рН 5,5). мРНК переосаждали, как описано выше, и очищали с помощью гель-фильтрации через спин-колонку «MicroSpin™ G-50 Columns» («GE Healthcare», Великобритания).

Трансляция *in vitro*, анализ полисом и детектирование мРНК. Трансляцию проводили в бес-

клеточной системе синтеза белка на основе экстракта из зародышей пшеницы в стационарном (batch) формате [1]. Трансляционную смесь инкубировали при 25° в объеме 25 мкл, реакцию останавливали добавлением 50 мкл буфера такого же состава, что и для приготовления растворов сахарозы для градиентов: 0,015 мкг/мл циклогексимида, 20 мМ Hepes-KOH, рН 8,0, 100 мМ KOAc, 5 мМ MgOAc, 0,1 мМ ЭДТА. Смесь наносили на 15–45%-ный сахарозный градиент. Центрифугирование проводили в течение 2 ч в роторе SW-41 при 37 000 об/мин и 4°. Непрерывную регистрацию оптической плотности в градиенте после центрифугирования проводили при 260 нм с использованием проточной кюветы. Распределение флуоресценции в сахарозном градиенте после центрифугирования также измерялось в проточной кювете (объем кюветы 120 мкл) на приборе RF-5103PC («Shimadzu», Япония) при длине волны возбуждения 492 нм (ширина щели 1,5 нм) и длине волны излучения 518 нм (ширина щели 15 нм). В течение времени измерения (~20 мин) выцветания флуоресцентной метки в данных условиях не наблюдалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Детектирование флуоресцентно-меченной мРНК в полисомах. На рис. 1 представлены результаты седиментационного анализа трансляционной смеси после 10 мин инкубации с флуоресцентно-меченной мРНК. Профиль оптической плотности в ультрафиолете показывает распределение рибосомного материала – полирибосом, рибосом и рибосомных субъединиц – после 10 мин работы системы. Профиль флуоресценции – это распределение мРНК, которой была запущена работа системы, через 10 мин работы системы, т.е. фактически распределение полирибосом, сформировавшихся за эти 10 мин. Основные выводы, которые можно сделать из рис. 1, следующие. Во-первых, совпадение положений пиков ультрафиолетового поглощения и флуоресценции однозначно свидетельствует о формировании полирибосом на меченой мРНК. Во-вторых, дискретность пиков делает возможной прямую оценку числа рибосом, т.е. оценку размеров полисом, в каждом пике. В-третьих, из профилей распределения ультрафиолетового поглощения и флуоресценции хорошо видно, какова может быть максимальная загрузка рибосомами использованной в экспериментах мРНК. Дискретный характер распределения пиков оптической плотности в профиле позволяет рассчитать загруженность мРНК рибосомами – в данном случае максимальное количе-



Рис. 1. Седиментационные профили трансляционной смеси после 10 мин трансляции с флуоресцентно-меченой мРНК: оптическая плотность (тонкая кривая) и флуоресценция (утолщенная кривая)

ство рибосом на одну молекулу мРНК было равно десяти («декасомы»). Примечательно, что распределение пиков флуоресценции меченой мРНК совпадает с распределением пиков оптической плотности в области полисом. Видно также, что на долю полисом приходится около половины всей связанной мРНК, тогда как с 80S рибосомами связывается лишь ~10% мРНК. Вместе с тем значительное количество мРНК (40%) оказывается связанным с 40S субъединицей, что, возможно, свидетельствует о присутствии в трансляционной смеси 48S рибосомных инициаторных комплексов. Таким образом, предлагаемый метод позволяет распознавать мРНК, находящуюся в разных комплексах с рибосомами, и проводить их количественную оценку.

Образование новых полисом в работающей системе. Описанный подход создал экспериментальную базу для ответа на вопрос: будут ли образовываться новые полисомы на вновь добавленной мРНК в работающей системе трансляции в присутствии ранее сформированных полисом? Для этого бесклеточная система синтеза белка запускалась добавлением немеченой мРНК, а через определенные промежутки времени работы в систему добавляли флуоресцентно-меченую мРНК. Уже после 10 мин работы системы значительная масса рибосом вовлекалась в полисомы (рис. 1). Результаты экспериментов, в которых вакантная мРНК была добавлена после 10 мин инкубации, представлены на рис. 2. Наличие пиков флуоресценции в полирибосомном профиле однозначно указывает на формирование новых полисом на добавленной матрице. В течение 5 мин после добавления мРНК образовывались новые полисомы, содержавшие 2–5 рибосом на молекулу мРНК (рис. 2, а). Дальней-

шее увеличение времени инкубации до 10 мин приводило к возрастанию размера и количества новых полисом (рис. 2, б). Таким образом, экспериментально показано, что в работающей бесклеточной системе трансляции на фоне уже сформировавшихся полирибосом продолжают образовываться новые полисомы на свободной мРНК, а также заполняются «вакансии» в полисомах, не до конца загруженных рибосомами.

Частичная разборка сформировавшихся полисом путем добавления свободной мРНК в систему трансляции. Бесклеточная система трансляции обычно запускается однократным добавлением мРНК в самом начале процесса. В наших экспериментах с добавлением свободной мРНК в транслирующую систему было интересно посмотреть, как ранее сформированные полисомы будут реагировать на появление вакантной матрицы. Для этого в систему с полисомами, изначально сформированными на флуоресцентно-меченой мРНК, добавляли новую порцию немеченой мРНК (рис. 3). Такая постановка эксперимента позволила отслеживать изменение полирибосомного профиля в сахарозном градиенте как по распределению оптической плотности (рис. 3, а), так и по распределению флуоресценции (рис. 3, б). В течение 10 мин трансляции в системе образовывались полисомы (рис. 3, а, б, сплошная черная кривая), которые по мере увеличения времени инкубации продолжали увеличиваться в размерах, т.е. прибавлялось количество рибосом на мРНК (рис. 3, а, б, сплошная серая кривая), если в систему не была добавлена новая мРНК. Однако увеличение размеров полисом путем привлечения новых рибосом оказалось возможным не только остановить, но и повернуть вспять. Именно этот эффект вызывало добавление новой мРНК (рис. 3, а, б, точечная кривая). Видно, что после добавления новой мРНК относительно «тяжелые» полисомы (8–10 рибосом в расчете на одну молекулу матрицы) переходят в менее загруженные формы (4–6 рибосом на матрицу). Таким образом, добавление свободной мРНК вызывало не только образование новых полисом (рис. 2), но и приводило к частичной разборке ранее сформированных полисом.

Пока остается непонятным механизм частичной разборки полисом, индуцированной свободной мРНК. Очевидно, что количество рибосом, отсоединившихся от мРНК, начинает преобладать над количеством рибосом, вновь присоединяющихся к матрице. В норме рибосома теряет связь с мРНК по завершении процесса терминации трансляции. Нельзя исключать случаи (особенно в бесклеточных системах), когда рибосома покидает мРНК досрочно, не завершив синтез полноразмерного белка. Наши

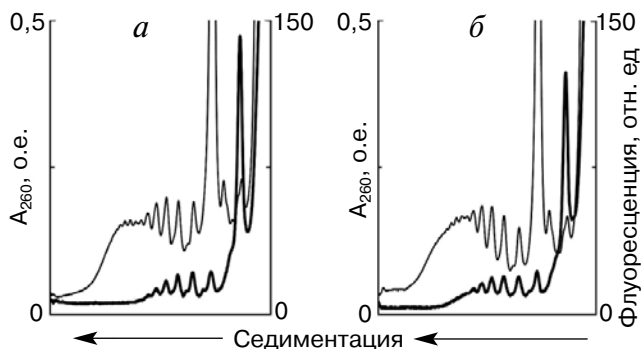


Рис. 2. Седиментационные профили трансляционной смеси: оптическая плотность (тонкие кривые) и флуоресценция (утолщенные кривые). *a* – 10 мин трансляции с немеченой мРНК + 5 мин трансляции после добавления флуоресцентно-меченной мРНК; *б* – 10 мин трансляции с немеченой мРНК + 10 мин трансляции после добавления флуоресцентно-меченной мРНК

эксперименты не позволяют выбрать между двумя этими возможностями. Если допустить нормальное прохождение процесса, то можно предположить, что свободная мРНК каким-то образом стимулирует терминацию трансляции, вследствие чего рибосомы отсоединяются от матрицы, и наблюдается частичная разборка полисом. В свете такой интерпретации возможна

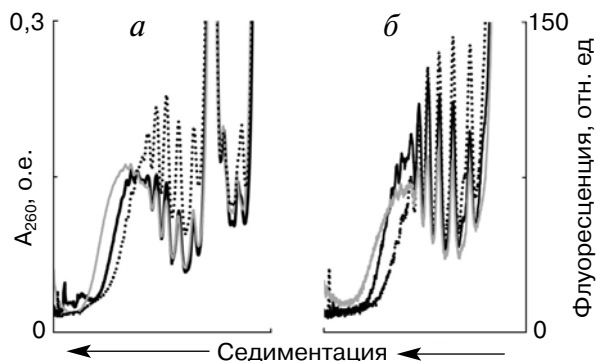


Рис. 3. Седиментационные профили трансляционной смеси: *a* – оптическая плотность, *б* – флуоресценция. Сплошные черные кривые – 10 мин трансляции с флуоресцентно-меченной мРНК, сплошные серые кривые – 15 мин трансляции с флуоресцентно-меченной мРНК, точечные кривые – 10 мин трансляции с флуоресцентно-меченной мРНК + 5 мин трансляции после добавления немеченой мРНК

прямая связь между процессами терминации трансляции полисомных рибосом и инициации трансляции свободных мРНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 15-04-01525-а, 13-04-40213-Н) и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shirokov, V.A., Kommer, A., Kolb, V.A., and Spirin, A.S. (2007) *Methods in molecular biology* (Grandi, G., ed.), Humana Press Inc., Totowa, N.J., 375, pp. 19–55.
2. Afonina, Z.A., Myasnikov, A.G., Shirokov, V.A., Klaholz, B.P., and Spirin, A.S. (2015) Conformation transitions of eukaryotic polyribosomes during multi-round translation, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 618–628.
3. Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., and Alakhov, Y.B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield, *Science*, **242**, 1162–1164.
4. Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., and Endo, Y. (2000) A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 559–564.
5. Alekhina, O.M., Vassilenko, K.S., and Spirin, A.S. (2007) Translation of non-capped mRNAs in a eukaryotic cell-free system: acceleration of initiation rate in the course of polysome formation, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6547–6559.
6. Pokrovskaya, I.D., and Gurevich, V.V. (1994) *In vitro* transcription: preparative RNA yields in analytical scale reactions, *Anal. Biochem.*, **220**, 420–423.

FORMATION OF NEW POLYSOMES ON FREE mRNAs IN CELL-FREE TRANSLATION SYSTEMS IS ACCOMPANIED BY PARTIAL DISASSEMBLY OF PREVIOUSLY FORMED POLYSOMES

E. A. Sogorin, S. Ch. Agalarov, A. S. Spirin*

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia; fax: +7(495)514-0218, E-mail: spirin@vega.protres.ru

Received May 6, 2015

A method for detection of the fluorescence-labeled mRNA in translating ribosomal complexes has been developed. It is demonstrated that in the working cell-free translation system with preformed polysomes, formation of new polysomes on free mRNA takes place. For the first time, it is shown that the process is accompanied by partial disassembly of the previously formed polysomes. This result is interpreted as an indication of the direct relationship between the processes of translation termination of polysomal ribosomes and translation initiation of free mRNAs.

Key words: eukaryotic polyribosomes, mRNA, cell-free translation system, fluorescence