

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ імені О.В. ПАЛЛАДІНА

На правах рукопису

БОРИСОВА Тетяна Олександрівна

***Вивчення транслокації секреторних
білків крізь мембрану***

03.00.04 - Біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

110.50.0004

Дисертація є рукопис.

Робота виконана у відділі
ім. О.В.Палладіна Національного

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00757184 (W)

Науковий керівник - доктор біологічних наук,
академік НАН України
Лішко В.К.

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук,
академік НАН України
Ельська Г.В.
доктор біологічних наук
Малшева М.К.

Провідна установа - Інститут фармакології та токсикології
АН України.

Захист відбудеться "23" грудня 1996 р.

о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України
(252601, Київ-30, вул.Леонтовича,9)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
біохімії НАН України.

Автореферат розісланий "22" листопада 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О.В.Кірсенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Транслокація попередників секреторних білків крізь мембрану - фундаментальний процес життєдіяльності клітини, про універсальність якого свідчить його суттєва схожість в різних організмах від бактерії до людини. Складність проблеми та експериментальних підходів до її вирішення до цього часу не дозволили розв'язати питання про те, яким чином великі гідрофільні молекули білку перетинають гідрофобну зону фосфоліпідного бішару. На поточний час немає загальноприйнятої точки зору відносно механізму та рушійних сил цього процесу.

Існує декілька гіпотез щодо механізмів трансмембранного переносу білків, але жодна з них не пояснює усіх аспектів транслокації. Сигнальна гіпотеза припускає існування складного білкового апарату, що приймає участь в розпізнаванні сигнального пептиду (рибонуклеопротеїновий комплекс, який отримав назву SRP) та руху поліпептиду, що синтезується, крізь мембрану [Blobel, 1975]. Вважають, що SRP може виконувати роль шаперона [Li, 1995; Wickner W, 1995]. Але потрібно відзначити, що як у еукаріотів, так і у прокаріотів існують білки, які досягають місця своєї внутріклітинної локалізації, не маючи сигнальної послідовності, котра відщеплюється протеазою [Cramer, 1983; Krieg, 1984]. В останні роки з'явилось багато експериментальних даних, які не знаходять пояснення в межах жодної концепції [Meyer, 1985; Hann, 1992.]. Одержані експериментальні факти, які безпосередньо або побічно протирічають моделі SRP-залежної транслокації [Wickner, 1995].

Гіпотезам автономної транслокації, які передбачають відсутність транслокатора білкової природи, протирічають результати експериментів по моделюванню процесу транслокації за участю різнома-

нітних білків мембрани ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) [Gorlich, 1993].

Остаточо не визначено також значення рибосом під час транслокації поліпептиду, що синтезується. Моделі, які розглядають процес котрансляційної транслокації, передбачають, що зв'язок рибосом з мембраною відбувається за допомогою спеціального рецептора. На роль потенційного рецептора було запропоновано декілька різних мембранних білків ЕПР. А.Севітс і Д.Мейер ідентифікували та очистили білок 180 кДа, та показали, що його присутність необхідна [Savitz, 1993; Wanker, 1995] і достатня [Savitz, 1990] для зв'язування рибосом з мембраною ЕПР *in vitro*. Інші автори вважають [Ohsumi, 1993; Ichimura, 1993], що функцію рибосомного рецептора може виконувати білок 34 кДа. Як відмічають К.Каліс, Д.Герліх та Т.Раппопорт, зв'язок рибосоми з мембраною здійснює білковий комплекс Sec61p [Kalies, 1994; Mothes, 1994; Nicchitta, 1995].

Хоч на теперішній час і виявлені мембранні білки, адатні зв'язуватися з рибосомами, природа взаємодії рибосом з мембраною ЕПР залишається неясною. Проведений аналіз дозволяє зробити висновок, що проблема транслокації білків ще дуже далека від остаточного рішення, незважаючи на значну кількість робіт, присвячених як безпосередньо експериментальним дослідженням, так і спробам теоретичного узагальнення.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було вивчення впливу фізико-хімічних властивостей мембран на процес їх взаємодії з рибосомами та на власне процес транслокації секреторних білків *in vitro*.

У завдання дослідження входило:

1. Розробити методичний підхід для дослідження процесу взає-

модії рибосом з мембранами, що базується на використанні "індикатора аліття" - флуоресцентного амфіфіла октадецила Родамін В хлорида.

2. Дослідити залежність процесу взаємодії рибосом з мембранами від заряду та розміру ліпосом, наявності розчинних білкових факторів, а також рН, концентрації іонів магнію та іонної сили середовища.

3. Дослідити можливість транслокації еукаріотичних секреторних білків (продуктів трансляції полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур) крізь штучну ліпідну мембрану.

4. Дослідити вплив фізико-хімічних властивостей мембрани ліпосом на рівень транслокації продуктів трансляції полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур.

Наукова новизна. Розроблена модель для дослідження процесу взаємодії рибосом з штучними та біологічними мембранами. Вперше застосовано флуоресцентний амфіфіл октадецил Родамін В хлорид в експериментах по вивченню впливу фізико-хімічних властивостей мембран на процес їх взаємодії з рибосомами. Встановлено, що між еукаріотичними 80S рибосомами, що входили до складу безклітинної білоксинтезуючої системи, та мембранами (як біологічними, так і штучними) існує безпосередня взаємодія, про що свідчить перерозподіл флуоресцентного зонду. Швидкість взаємодії рибосом з мембраною залежить від заряду мембрани ліпосом, рН, концентрації іонів магнію та іонної сили середовища. Доведена можливість транслокації попередників еукаріотичних секреторних білків (продуктів трансляції полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур) крізь штучну ліпідну мембрану. Рівень транслокації залежить від фізико-хімічних властивостей мембрани ліпосом (заряду та рідинних властивостей).

Практична значимість роботи. Одержані результати розширюють існуючі уявлення щодо механізму транслокації білків, як основного процесу життєдіяльності клітини, а також впливу фізико-хімічних властивостей мембран на цей процес. Розуміння молекулярного механізму транслокації поліпептидів крізь мембрану є необхідним етапом на шляху розробки методів керування секрецією білків. Встановлення ролі фосфоліпідів у цьому процесі створє можливість для регулювання рівня секреції шляхом впливу на мембрану, що може знайти своє використання в біотехнології.

Положення, що виносяться на захист.

1. Показана можливість використання флуоресцентного амфіфіла октадецила Родаміна В хлорида для вивчення взаємодії рибосом з штучними і біологічними мембранами. Проаналізована залежність швидкості взаємодії еукаріотичних 80S рибосом з мембраною від заряду мембрани ліпосом, pH, концентрації іонів магнію та іонної сили середовища.

2. Встановлена можливість транслокації попередників еукаріотичних секреторних білків крізь штучну фосфоліпідну мембрану *in vitro*, з використанням системи, яка моделює процес транслокації (система містить полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур, безклітинну білоксинтезуючу систему із зародків пшениці та ліпосоми різного фосфоліпідного складу).

3. Показана залежність рівня транслокації продуктів трансляції полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур в безклітинній білоксинтезуючій системі із зародків пшениці від фізико-хімічних властивостей мембрани ліпосом (заряду та рідинних властивостей).

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на щорічних звітних конференціях по космобіології (Інститут ботаніки ім.М.Г.Холодного НАН України, грудень 1994, грудень 1995 рр), наукових семінарах Інституту молекулярної біології та генетики НАН України та Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу , огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, заключення, висновків, переліку літератури (168 джерел). Робота викладена на 120 сторінках машинопису, містить 24 рисунка.

Особистий внесок дисертанта. Експериментальна частина роботи виконана дисертантом особисто. Аналіз та обговорення проведено спільно з науковим керівником. Друковані праці підготовані за безпосередньої участю автора.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Для дослідження впливу фізико-хімічних властивостей мембран на процес їх взаємодії з рибосомами була використана безклітинна білоксинтезуюча система із зародків пшениці (ББС) [Marcus, 1974]. Електрофоретичний аналіз білків, які входять до складу ББС, проводили за методом Леммлі [Laemmli, 1970]. Очищені рибосоми одержували шляхом високошвидкісного центрифугування [Marcus, 1974]. В роботі були використані ліпосоми двох типів: великі, що готувалися методом "звернення фаз" [Szoka, 1978], та малі, які були одержані шляхом диспергування фосфоліпідів у буфері [Марголіс, 1986; Трикаш, 1987]. Діаметр ліпосом визначався методами електронної мікроскопії та спектроскопії оптичного змішування [Трикаш, 1987]. Мікросоми одержували з печінки щура [Мадди, 1979; Финдлей, 1990]. Флуоресцентний амфіфіл октадецил Родамін В хлорид (R18) включали

до ліпосом згідно з методом та експериментальними даними Д.Хекстра [Hoekstra, 1984; Hoekstra D, 1985; Vidal, 1995], з використанням запропонованого ним співвідношення R18:ліпід. Включення R18 у ББС та мікросоми здійснювали з використанням співвідношення R18:білок, рекомендованого Д.Хекстра [Hoekstra, 1984]. Вимірювання флуоресценції препаратів проводили на флуоресцентному спектрофлуориметрі Hitachi 650-10S.

До складу системи, яка моделювала процес транслокації, входили: ББС, ліпосоми, що були одержані шляхом "звернення фаз", та полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур. Полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур виділяли за допомогою модифікованого методу фенольної екстракції [Rosen, 1975; Auffray, 1980], та афінної хроматографії на полі(U) сефарозі-4В [Рачков, 1984; Стародуб, 1986]. Електрофоретичний аналіз препаратів РНК для оцінки якості отриманих препаратів виконували по Лоєнінгу [Loening, 1976], з використанням рекомендації Роузена [Rosen, 1975], в 4% поліакриламідному гелі. Визначення біологічної активності отриманих препаратів РНК здійснювали в ББС з зародків пшениці [Стародуб, 1986]. Визначення кількості продукту, вбудованого в ліпосоми котрансляційно, проводили згідно [Балков, 1988]. Радіоактивність протеолітично (проназа Е) нерозщепленого білку після осадження трихлороцтовою кислотою (ТСА) визначали на фільтрах в толуоловій сцинтиляційній рідині ЖС-1. Для встановлення кількості зрілого білку, що зв'язувався з ліпосомами, в модельну систему замість мРНК додавали [¹²⁵I]-мічений овальбумін [McLohanay, 1980].

Бішарову ліпідну мембрану (БЛМ) формували з розчину фосфатиділхоліну та холестерину в співвідношенні 2:1 в n-гептані згідно з методом, запропонованим П.Мюллером [Mueller, 1962; Zhukareva, 1992]. Ємнісний ефект БЛМ фіксували як короткочасне збільшення

току крізь мембрану під час подачі постійної напруги +50 мВ.

Статистична обробка даних проводилась загальноприйнятими методами варіаційної статистики [Плохинский, 1980].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Дослідження впливу фізико-хімічних властивостей мембран на процес їх взаємодії з рибосомами.

Було встановлено, що препарат ББС при введенні в комірку з пласкою бішаровою ліпідною мембраною збільшував її провідність (рис.1), тобто в ньому були присутні мембраноактивні елементи. Було досліджено ємнісний ефект пласкої бішарової ліпідної мембрани до та після введення рибосом, що були отримані з ББС методом високошвидкісного центрифугування. Після додавання рибосом в комірку (0,55 мкг/мл) величина ємнісного ефекту мембрани знизилася на 10%. Можливо, товщина мембрани збільшилася за рахунок осідання на ній рибосом. Можна припустити, що рибосоми здатні до взаємодії з мембраною без залучення у цей процес рецепторів білкової природи.

При дослідженні взаємодії рибосом, що входили до складу ББС, з штучними та біологічними мембранами був використаний флуоресцентний амфіфіл октадецил Родамін В хлорид (R18), який раніше використовувався виключно при дослідженні злиття мембран. Метод базувався на здатності "індикатора злиття" мембран - флуоресцентного зонду R18 до самогашення. Як показано Д.Хекстра [Hoekstra, 1984] при злитті R18-міченого та неміченого мембранних препаратів спостерігається збільшення флуоресценції внаслідок зниження самогашення зонду, що викликано зменшенням поверхневої густини. Перенос R18 з однієї мембрани до іншої має місце виключно при їх злитті. Вихід зонду з мембрани і його спонтанна дифузія крізь

Рис.1. Ступінчасте підвищення тока крізь БЛМ при постійній напрузі +50мВ. Препарат ББС додавали з цис сторони БЛМ, кінцева концентрація дорівнювала 0,5 мкг/мл. Розчин, що знаходився з обох сторін мембрани, містив 40 мМ Нерес рН 7,4, 110 мМ хлориду калія, 1 мМ ацетата магнія.

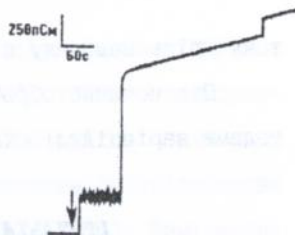


Рис.2. Зміна флуоресценції R18 при взаємодії R18-мічених рибосом (50 мкг/мл) і малих ліпосом: 1,2 від"ємно заряджених (o), 3,4-нейтральних (x) при концентрації ліпіда в середовищі інкубації: 1,3 - 20 мкг/мл, 2,4 - 40 мкг/мл.

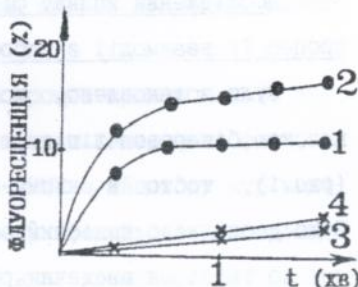


Рис.3. Зміна флуоресценції R18 при взаємодії R18-мічених рибосом (50 мкг/мл) і великих ліпосом: А,Б,В-від"ємно заряджених (o), Г,Д-нейтральних (x) при концентрації ліпіда в середовищі інкубації: А-20 мкг/мл, Б,Г-40 флуоресценція (%) мкг/мл, В,Д- 60 мкг/мл.

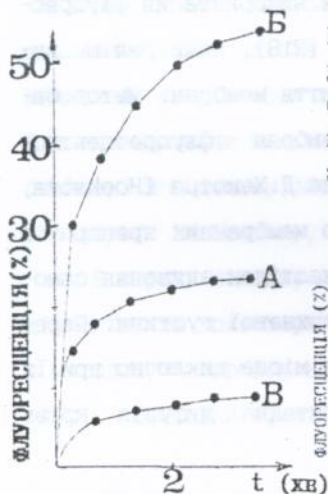
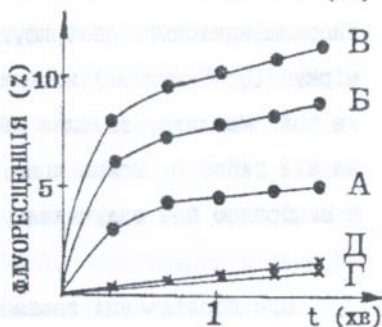
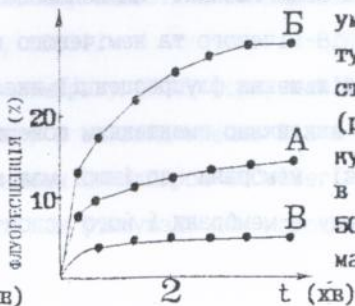


Рис.4. Зміна флуоресценції R18 при взаємодії R18-мічених рибосом (50 мкг/мл) з ліпосомами (60 мкг/мл): малими від"ємно зарядженими (лівий рисунок) і великими від"ємно зарядженими (правий рисунок): А-в звичайних умовах експерименту; Б- в присутності 20 мкл 1М MOPS (рН середовища інкубації 6,0), В- в присутності 50 мкл 2М ацетата магнія.



водну фазу, а також перерозподіл флуоресцентного амфіфілу при агрегації мембран виключені [Hoekstra, 1984; Hoekstra, 1985; Vidal, 1995].

В межах цієї роботи флуоресцентний зонд вводили як в рибосоми, так і в мембрани. При включенні зонду в рибосоми була підібрана оптимальна концентрація R18, при якій величина самогашення флуоресцентного зонду (Q) була в межах від 0,88 до 0,92. Значення Q визначалося за формулою $Q=1-F_0/E_0$, де F_0 та E_0 - відповідно флуоресценція зразку до і після додавання Тритону X-100 до кінцевої концентрації 0,5 % v/v. (Тритон X-100 не впливає на інтенсивність флуоресценції зонду) [Hoekstra, 1984]. Ефективність включення флуоресцентного зонду в рибосоми, що входили до складу БЕС з зародків пшениці, за нашою оцінкою складала близько 100%, при цьому кінцева концентрація зонду складала 13 нмоль на мг РНК.

Взаємодія між R18-міченими і неміченими рибосомами не приводила до зміни інтенсивності флуоресценції. Додавання ацетату магнію (0,1M) також не призводило до зміни флуоресценції, незважаючи на те, що високі концентрації Mg^{2+} сприяли димеризації рибосом, а також подальшій агрегації димерів [Спирин, 1971]. Це свідчило про те, що між рибосомами не відбувався перерозподіл флуоресцентного зонду.

Досліджена взаємодія рибосом з малими ліпосомами (діаметр 20-30 нм) як нейтральними, так і від'ємнозарядженими. При додаванні до R18-міченого препарату рибосом нейтральних лецитинових ліпосом флуоресценція зростала (рис.2). Це свідчило про існування взаємодії між мембраною та рибосомою, внаслідок якої відбувалося розбавлення флуоресцентного амфіфілу R18. Як видно з рис.2, процес взаємодії залежав від кількості внесених ліпосом. За нульовий рівень приймали залишкову флуоресценцію R18-міченого препарату.

За 100 %- значення флуоресценції після розведення зонду в присутності детергенту (Тритону X-100).

При додаванні до R18-міченого препарату рибосом від'ємнозаряджених ліпосом (одержаних шляхом вилучення до окладу ліпосом фосфатидилетаноламіну та від'ємнозарядженого кардіоліпіну у молярному співвідношенні фосфатидилхолін:фосфатидилетаноламін :кардіоліпін 2:3:5) зростання флуоресценції відбувалось з більшою швидкістю. Можливо, ефективність взаємодії рибосом з від'ємнозарядженими ліпосомами більше, ніж з нейтральними (рис.2).

Досліджена також взаємодія рибосом з великими нейтральними та від'ємнозарядженими ліпосомами діаметром більше, ніж 80 нм (рис.3). Процес взаємодії у цьому випадку також залежав від кількості ліпосом та заряду на їх поверхні. Можна припустити, що ліпідний склад мембран робить свій внесок в процес взаємодії рибосом з мембраною ЕПР як при акумуляції рибосом на мембрані ЕПР, так, імовірно, і в процесі транслокації білку. Не виключена можливість того [Adelman, 1973; Wanker, 1995], що існують два функціонально різних типи взаємодії рибосом з мембраною при транслокації білку та без неї.

Як видно з рис. 2 і 3, рибосоми взаємодіють з малими ліпосомами більш ефективно, ніж з великими. Дійсно, флуоресценція збільшувалась на 20 % після 90 хв. інкубації мічених рибосом (50 мкг/мл) і великих лецитинових ліпосом (40 мкг/мл). Таке ж саме збільшення флуоресценції спостерігалось при використанні малих лецитинових ліпосом вже після 4,5 хв інкубації. Можна припустити, що на швидкість взаємодії рибосом з мембранами впливала різниця кривизни поверхні ліпосом. Проте, імовірно, при однаковій концентрації ліпиду препарати великих та малих ліпосом мали різну площу поверхні везикул.

При підкисленні середовища інкубації до рН 6 флуоресценція зростала приблизно в 2 рази, тобто швидкість взаємодії рибосом з від'ємнозарядженими ліпосомами залежала від рН (рис.4). Очевидно, під впливом низьких значень рН середовища змінювалась електростатична взаємодія між рибосомами та мембранами. Зміна рН середовища інкубації не впливала на взаємодію рибосом з лецитиновими ліпосомами.

Дослідження взаємодії рибосом з біологічними мембранами проводили на мікросомах. На рис.5 представлена зміна флуоресценції R18 при взаємодії R18-мічених рибосом та мікросом.

Відомо, що високі концентрації хлористого калію від 100 до 1000 мМ викликають часткову дисоціацію рибосом з мембрани ЕПР. В експериментах присутність в інкубаційному середовищі KCl знижувала швидкість взаємодії рибосом як з ліпосомами, так і з мікросомами (рис.6).

Була досліджена можливість взаємодії рибосом з ліпосомами в присутності 0,1М ацетату магнію. Як видно з рис. 4 та 5, швидкість взаємодії в цьому випадку менше, ніж в звичайних умовах експерименту. Зниження швидкості взаємодії спостерігалось також і при відсутності іонів магнію, що досягалось додаванням у середовище інкубації EDTA до кінцевої концентрації 11мМ, тому що магній є обов'язковим низькомолекулярним компонентом рибосом.

Таким чином, процес взаємодії рибосом з мембраною залежить від заряду мембрани ліпосом, концентрації іонів магнію та іонної сили середовища.

Для вивчення ролі білків в процесі взаємодії рибосом з ліпосомами була проведена протеолітична обробка препарату рибосом (проназа Е). Виявилось, що після протеолізу рибосоми також взаємодіють з ліпосомами, але з меншою швидкістю. Тож, взаємодія ри-

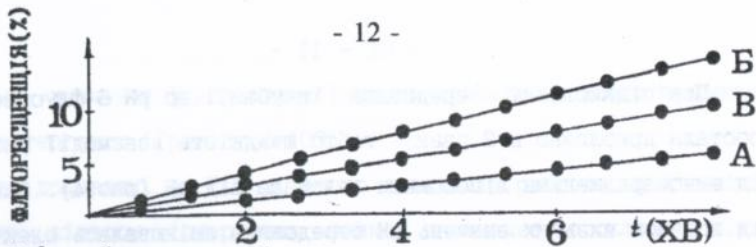


Рис.5. Зміна флуоресценції R18 при взаємодії R18-мічених рибосом (50 мкг/мл) і мікросом при концентрації мікросомного білку: А - 5 мкг/мл, Б,В-20 мкг/мл. А,Б - в звичайних умовах експерименту, В - в присутності 50 мкл 2М ацетата магнія.

Рис.6. Залежність флуоресценції R18 від концентрації KCl в середовищі інкубації. Вивчали взаємодію R18-мічених рибосом (50 мкг/мл) і : А- малих нейтральних ліпосом (40 мкг/мл), Б-великих нейтральних ліпосом (40 мкг/мл), В- мікросом (20 мкг білку на мл).

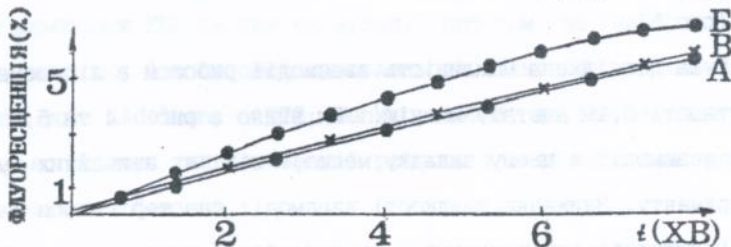
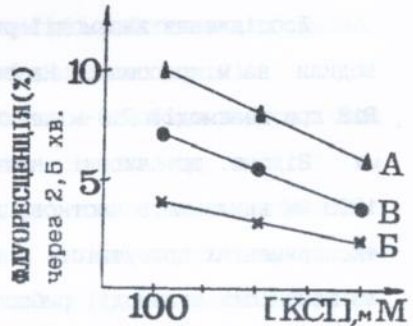


Рис.7. Зміна флуоресценції R18 при взаємодії R18-мічених великих від'ємно заряджених ліпосом : А,Б- з препаратом рибосом (250 мкг/мл), В- з очищеними рибосомами (82 мкг/мл) при концентрації ліпіда в середовищі інкубації: А,Б-9 мкг/мл, В-18 мкг/мл.

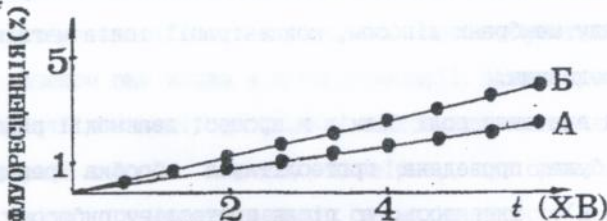


Рис.8. Зміна флуоресценції R18 при взаємодії препарату рибосом (50 мкг/мл) і R18-мічених мікросом при концентрації мікросомного білку: А-2,1 мкг/мл, Б-6,3 мкг/мл.

босом з фосфоліпідними мембранами може проходити і після деградації доступних для протеази білкових компонентів.

Як відмічалось, при включенні зонду в мембрану не спостерігається його спонтанна дифузія крізь водну фазу і перерозподіл при агрегації мембран. Таким чином, збільшення флуоресценції при взаємодії R18-міченого мембранного препарату з рибосомами підтвердило б зроблене вище припущення про існування такої взаємодії між мембраною та рибосомою, що призводить до розбавлення флуоресцентного амфіфілу R18. Дослідження, проведені на від'ємнозаряджених ліпосомах, що містили флуоресцентний зонд R18 (кінцева концентрація - 2 моль % по відношенню до загального вмісту ліпиду), та немічених рибосомах, що входили до складу БЕС, підтверджують це припущення. R18 включали до ліпосом згідно з методом та експериментальними даними Д.Хекстра [Hoekstra, 1984; Hoekstra D, 1985; Vidal, 1995] з використанням запропонованого ним співвідношення R18:ліпід. З рисунка 7 видно, що при додаванні рибосом до мічених ліпосом флуоресценція збільшувалась. При заміні препарату рибосом очищеними рибосомами, одержаними методом високошвидкісного центрифугування, також спостерігалось збільшення флуоресценції при взаємодії з ліпосомами. Таким чином, рибосоми, як очищені, так і ті, що входили до складу БЕС, взаємодіяли з від'ємнозарядженими ліпосомами. Є підстави вважати, що саме рибосоми визначали здатність препарату БЕС взаємодіяти з фосфоліпідними мембранами.

Вивчена взаємодія R18-мічених мікросом з рибосомами, що входили до складу БЕС. Включення флуоресцентного зонду в мікросоми проводили за методом Д.Хекстра [Hoekstra, 1984; Hoekstra, 1985, Vidal, 1995] із співвідношенням R18:білок, рекомендованим автором. При цьому самогашення флуоресценції було 0,92, а кінцева концентрація зонду 94 нмоль на мг мікросомного білку. Було вияв-

лено, що при взаємодії R18-мічених мікросом з рибосомами також має місце збільшення флуоресценції (рис.8). Збільшення флуоресценції при взаємодії R18-міченого мембранного препарату з неміченими рибосомами було свідомством існування контакту між мембраною та рибосомою, достатнього для того, щоб відбулося розбавлення флуоресцентного амфіфілу R18.

Імовірно рибосоми, як рибонуклеопротеїди дуже складної структури, здатні взаємодіяти з фосфоліпідною мембраною. Можливо, процес взаємодії супроводжується зміною бішарової структури мембрани. Взаємодія рибосом з фосфоліпідними мембранами може мати місце і після деградації доступних для протеази білкових компонентів. Процес взаємодії рибосом з мембраною може відігравати ключову роль при котрансляційній транслокації. Але не виключена можливість того, що він має місце лише при взаємодії з мембраною тих рибосом, які на даний момент не залучені до процесу трансляції, тобто тією частиною пула рибосом, котра акумулюється на мембрані незалежно від того, має місце транслокація білку чи ні.

Взаємодія продуктів трансляції мРНК секреторних білків з штучними фосфоліпідними везикулами.

Не виключена можливість того, що рибосоми приймають активну участь, а можливо і відіграють головну роль в процесі транслокації білку. В зв'язку з цим припущенням здавалось доцільним дослідити принципову можливість котрансляційної транслокації секреторних білків в штучні фосфоліпідні везикули з використанням модельної системи.

Була вибрана фракція полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур, котра кодує синтез кількох секреторних білків (овальбумін, кональбумін, овомукоїд, лізоцим). З цих білків особливий інтерес може мати овальбумін. Це секреторний білок, сигнальна амінокислотна послі-

довність якого локалізована між залишками 22 і 41 [Krieg, 1984], не відщеплюється в процесі транслокації. Використана фракція полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур являла собою гетерогенний препарат. Відомо, що така РНК кодує як білки яйця, котрі секретуються з клітини, так і власні внутрішньоклітинні білки яйцеводу, що не секретуються. Трансляцію мРНК проводили в еукаріотичній системі трансляції -ЕБС із зародків пшениці. Додавання 1мкг полі(A)⁺-мРНК в ЕБС стимулювало включення в ТСА-осаджені білки з поміля [35S]-метіоніна. Як модель мембрани були використані ліпосоми, фосфоліпідний бішар яких первісно не містив ніяких білкових компонентів.

Трансляція фракції полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур відбувалася як в присутності мембран, так і без них. Електрофоретичний аналіз продуктів трансляції показав наявність широкого спектру білків, характерних для даної тканини. Він був таким самим, як при трансляції з ліпосомами (котрансляційний зв'язок), так і без ліпосом. Таким чином, відсутність мембран під час синтезу білку не була фактором селективного пригнічення, або навпаки, селективної стимуляції трансляції індивідуальних мРНК. Це дало можливість порівняти результати котрансляційної та посттрансляційної взаємодії продуктів трансляції з ліпосомами.

Для визначення кількості зрілого білку, що може зв'язатися з ліпосомами, був використаний мічений овальбумін, який є одним з основних продуктів трансляції мРНК з яйцеводу кур. Як показав електрофоретичний аналіз, препарат овальбуміна містить не більше 10 % домішок інших білків яйця. Виявлено, що практично всі білки, що зв'язувались з ліпосомами, видалялися при обробці проназою. Отже, зрілі білки не здатні перетинати ліпідний бішар за умов модельної системи. Крім того, можна вважати, що в процесі проведен-

ня експерименту не мали місця захоплення білків ліпосомами (при центрифугуванні та інших методичних процедурах), а також взаємодія везикул з продуктами протеолітичного розщеплення білків.

Для дослідження можливості транслокації еукаріотичних секреторних білків крізь мембрану були використані ліпосоми рівного ліпідного складу. При використанні електронеутральних везикул, одержаних з яєчного лецитину (концентрація ліпиду 5 мг/мл), недоступними дії пронази виявилися 5 % і 2,4 % від вихідного синтезованого білку при котрансляційній та посттрансляційній взаємодії з ліпосомами відповідно. Ці величини до деякої міри є заниженими, бо, як відмічалось вище, використана мРНК кодувала не тільки секреторні білки, а й власні внутрішньоклітинні білки яйцеводу, які не є секреторними. З метою оптимізації модельної системи була збільшена концентрація ліпиду до 10 мг/мл. При цьому котрансляційно з ліпосомами зв'язувалось 10 %, а посттрансляційно - 4 % синтезованого білку. Ці результати відображені на рис.9. Подальше збільшення кількості ліпосом було неможливим, тому що спостерігався негативний вплив ліпиду на рівень синтезу білків.

З літератури відомі дані, які свідчать про вплив кислих фосфоліпідів на процеси транслокації у бактерій [Неомеянова, 1987]. Показано, що введення кислих фосфоліпідів, наприклад кардіоліпіна, до складу фосфоліпідного бішару створює на його поверхні від'ємний заряд, а також викликає деякі структурні зміни, наприклад утворення гексагональної фази.

Для виявлення ролі заряду на поверхні мембрани ліпосом до складу лецитинової ліпосомальної мембрани включили кардіоліпін в молярному співвідношенні лецитин: кардіоліпін 9,5:0,5. При цьому виявлено, що кількість білків, недоступних дії пронази, збільшилась до 7 % - при котрансляційній взаємодії та до 2,7 % - при

Рис.9. Залежність рівня включення продуктів трансляції полі(А)⁺-мРНК з яйцеводу кур в ліпосоми з яєчного лецитину від концентрації ліпіда: А- при котрансляційній взаємодії з ліпосомами, Б- при посттрансляційній взаємодії з ліпосомами. В- включення в ліпосоми овальбуміна. За 100% приймали кількість первісно синтезованого в БЕС білку. *р< 0,05

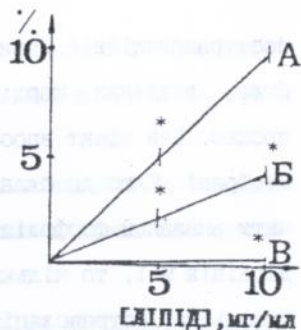


Рис.10. Залежність рівня включення продуктів трансляції полі(А)⁺-мРНК з яйцеводу кур в ліпосоми, приготовані з лецитину морських організмів, від концентрації ліпіда: А- при котрансляційній взаємодії з ліпосомами, Б- при посттрансляційній взаємодії з ліпосомами. В- включення в ліпосоми овальбуміна. *р< 0,05

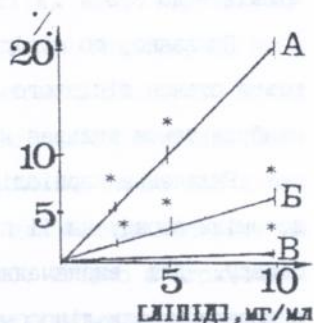
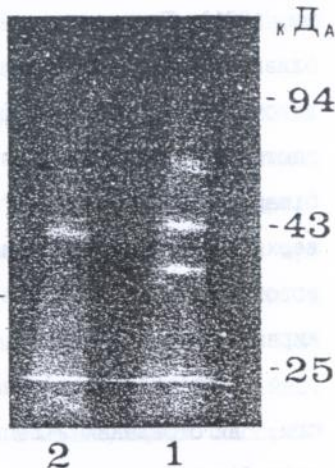


Рис.11. Авторадіограма електрофоретичного аналізу продуктів трансляції полі(А)⁺-мРНК з яйцеводу кур, недоступних дії пронази:

- 1) при котрансляційній взаємодії з ліпосомами,
- 2) при посттрансляційній взаємодії з ліпосомами.



посттрансляційній (при концентрації ліпиду у системі 5 мг/мл). Отже, введення кардіоліпіну суттєво впливало на досліджуваний процес. Цей ефект зростав із збільшенням кількості кардіоліпіну у мембрані. Якщо до складу лецитинової ліпосомальної мембрани включити вказаний фосфоліпід в молярному співвідношенні лецитин:кардіоліпін 9:1, то кількість білку, на який не діє проназа, збільшилась при котрансляційній взаємодії до 10 %, а при посттрансляційній - до 3,3 %.

Показано, що ліпід-білкові взаємодії в значній мірі визначаються станом ліпідного бішару. Можливо, що *in vivo* ліпідний склад мембран також впливає на процес транслокації.

Включення кардіоліпіну до складу мембрани призводить не лише до зміни заряду на її поверхні, але й структури фосфоліпідного бішару. Для визначення ролі останньої в досліджуваному процесі використовували ліпосоми, виготовлені з лецитину, виділеного з морських організмів. В препараті цього лецитину ненасичені жирні кислоти складали 70 % (моноенові 14 %, а поліенові 56 %) [Терехова, 1981]. Препарат, що використовувався (ячний лецитин), містив близько 60 % ненасичених жирних кислот [Трикаш, 1987]. Ліпосоми, виготовлені з лецитину, виділеного з морських організмів, відрізняються від везикул з ячного лецитину рідинними властивостями бішару, але при цьому зберігають нейтральний заряд на своїй поверхні. Відомо [Марголіс, 1986], що на температуру основного фазового переходу ліпідів впливає довжина та ступінь ненасиченості жирнокислотних ланцюгів.

Як свідчать дані, наведені на рис.10, при застосуванні ліпосом, виготовлених з лецитину, що виділяли з морських організмів, доля білків, на які не діє проназа, така ж, як і у випадку, коли ліпосоми були виготовлені з суміші ячний лецитин:кардіоліпін

9:1, тобто 10 % та 3,3 % відповідно. При збільшенні концентрації цього лецитину до 10 мг/мл, ці величини зростали до 20 % та 6,2 % відповідно.

Треба відмітити, що в модельній системі кількість котрансляційно включеного в ліпосоми білку знаходилась в прямо пропорційній залежності від кількості внесених ліпосом.

Здаються цікавими результати, отримані на ліпосомах з лецитину морських організмів при трансляції полі(A)⁺-мРНК з ретикулоцитів кролів, яка кодувала переважно один білок-глобін, що не є секреторним [Лимборская, 1976]. При концентрації ліпиду 10 мг/мл кількість синтезованого в системі білку, що недоступний дії пронази, зменшувалась до 2,2 % при котрансляційній та до 1,2 % при посттрансляційній взаємодії з ліпосомами (для білків яйцеводу за таких самих умов 20 % та 6,2 % відповідно). Згідно з отриманими даними секреторні та несекреторні білки по різному взаємодіють з ліпосомами, це свідчить про адекватність використаної модельної системи. Компетентність до ко- та посттрансляційної транслокації визначається наявністю сигнальної послідовності у поліпептидного ланцюга.

Для вивчення питання про те, чи вбудовуються лише короткі фрагменти в фосфоліпідний бішар, або має місце повне проникнення синтезованих поліпептидів у внутрішній об'єм везикул, були проаналізовані білки, недоступні дії пронази, як при ко-, так і при посттрансляційній взаємодії з ліпосомами. При аналізі результатів котрансляційної взаємодії можна бачити зони, що відповідають білкам з молекулярною масою 79,43 та 32 кДа. Після посттрансляційної взаємодії чітко наявна лише одна полоса з молекулярною масою 43 кДа (рис.11).

В системі, що використовувалась, транслокація синтезованого

продукту крізь ліпідну мембрану здійснювалась переважно котрансляційно. Не виключена можливість, що посттрансляційно взаємодіє з ліпосомами овальбумін - секреторний білок, що не має сигнальної послідовності, що відщеплюється. На користь цього свідчать дані разрахунків щодо можливості транслокації овальбуміну крізь мембрану шляхом спонтанного вбудовування [Fidelio, 1987]. Тому не можна виключити також, що деяка кількість овальбуміна здатна до посттрансляційного включення в ліпосоми при вивченні котрансляційної взаємодії продуктів трансляції полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур з везикулами.

На підставі наведених вище даних можна зробити висновок, що рівень транслокації секреторних еукаріотичних білків крізь штучну фосфоліпідну мембрану суттєво залежить від її фізико-хімічних властивостей.

Було показано, що за умов модельної системи має місце вбудовування еукаріотичних позаклітинних білків в штучні фосфоліпідні везикули, які первісно не містили ніяких білкових компонентів. Отже, відсутність мембранних білків не є перешкодою для подолання новосинтезованим поліпептидом фосфоліпідного бішару. Таким чином, дослідження, проведені з використанням модельної системи транслокації, узгоджуються з наведеними вище експериментальними даними, одержаними за допомогою флуоресцентного зонду R18, щодо впливу фізико-хімічних властивостей мембран на процес їх взаємодії з рибосомами.

Імовірно рибосома, як клітинна органела, за своїми фізико-хімічними властивостями здатна до взаємодії з мембраною, змінюючи її структуру і таким чином створюючи можливість новосинтезованому поліпептиду долати фосфоліпідний бішар, використовуючи енергію елонгації при котрансляційній транслокації.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методичний підхід, що дозволяє вивчати вплив фізико-хімічних властивостей мембран на процес їх взаємодії з рибосомами. Він базується на використанні флуоресцентного амфіфіла октадецила Родаміна В хлорида (R18), що включався як в мембрани (штучні та біологічні), так і в рибосоми, що входили до складу безклітинної білоксинтезуючої системи із зародків пшениці.

2. В експериментах *in vitro* з використанням R18 показано, що між еукаріотичними 80S рибосомами та мембранами як штучними (ліпосоми різного фосфоліпідного складу), так и біологічними (мікросоми) існує безпосередня взаємодія, про що свідчить перерозподіл флуоресцентного зонду.

3. Швидкість взаємодії еукаріотичних 80S рибосом з мембраною залежить від заряду мембрани ліпосом, рН, концентрації іонів магнію та іонної сили середовища.

4. В експериментах *in vitro* з використанням системи, що моделює процес транслокації (система містить полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур, безклітинну білоксинтезуючу систему із зародків пшениці та ліпосоми різного фосфоліпідного складу), показана можливість транслокації попередників еукаріотичних секреторних білків крізь мембрану, що первісно не містила у своєму складі білкових компонентів. Транслокація продуктів трансляції мРНК крізь фосфоліпідну мембрану здійснюється переважно котрансляційно.

5. Рівень транслокації продуктів трансляції полі(A)⁺-мРНК з яйцеводу кур в безклітинній білоксинтезуючій системі із зародків пшениці суттєво залежить від фізико-хімічних властивостей мембрани ліпосом (заряду та рідинних властивостей).

ПЕРЕЛІК РОБІТ,ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Борисова Т.А., Лось Г.В., Липко В.К. Связывание продуктов трансляции мРНК секреторируемых белков с искусственными фосфолипидными везикулами // Биохимия.-1994.- **59**, вып.10.- С.1483-1489.
2. Борисова Т.А., Липко В.К., Блюм Н.О., Лось Г.В. Взаимодействие предшественников секреторируемых белков и компонентов бесклеточной белокинтегрирующей системы с фосфолипидными мембранами // Укр.биохим.журн.-1996.- **68**, N 5.- С.34-40.
3. Борисова Т.А., Трикаш И.О., Липко В.К. Взаимодействие рибосом с мембранами in vitro // Укр.биохим.журн.-1996.- **68**, N 5.- С.41-47.

Borisova T.A. Studing of the translocation of secretory protein precursors across membrane (manuscript).

The dissertation work on the degree of candidate of biological sciences (speciality 03.00.04.-biochemistry). Palladin institute of biochemistry of Ukrainian NAS,Kiev,1996.

Using the fluorescent indicator of fusion- octadecyl Rhodamine B-chloride the direct interaction between eukaryotic 80S ribosomes and membranes (as artificial as biological) has been shown. It has been studied the dependence of interaction process on charge and size of liposomes, proteins,pH,

concentration of Mg^{2+} ions and ionic strength of the medium.

The opportunity of translocation of eukaryotic secretory proteins (the products of translation poly (A)⁺-mRNA from chicken oviduct) through membrane , that initially does not contain any protein components, has been established. The level of translocation of the products of translation in weat germ cell-free system substantially depends on the physical and chemical properties of the liposome membranes.

Борисова Т.А. Изучение транслокации секретируемых белков через мембраны (рукопись).

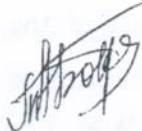
Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04.-биохимия. Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 1996.

Используя флуоресцентный амфифил октадецил Родамин В хлорид, было показано, что между эукариотическими 80S рибосомами и мембранами как искусственными, так и биологическими существует непосредственное взаимодействие. В работе было изучено влияние заряда и размера липосом, белков, а также pH, концентрации ионов магния и ионной силы среды на процесс взаимодействия рибосом с мембранами.

Исследована возможность транслокации эукариотических секретируемых белков (продуктов трансляции поли(A)⁺-мРНК из яйцевода кур) через мембрану липосом, изначально не содержащую в своем составе никаких белковых компонентов. Показана зависимость уровня

транслокации продуктов трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы от физико-химических свойств мембраны липосом (заряда и жидкости).

Ключові слова: ліпосоми, мікросоми, рибосоми, білок, трансляція, транслокація.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. H. 2019', is written over the text.

Подписано к печати 19.11.96г. Формат 60x84/16.
Объем: 1.0 усл.-печ.л., 1.0 уч.-изд.л.
Тираж 100. Заказ 83.

Типография во Флоровском монастыре
тел. 416-54-62

4380 95

AB 36.224