

А. Н. РЕКЕШ, Л. Ф. ЛИДЕМАН, Т. Н. ЗАВЕНЯГИНА. [В. Ю. ГАВРИЛОВ]

## ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ESCHERICHIA COLI IN VITRO

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 14 II 1974)

Известно, что в бактериальной клетке регуляция экспрессии генов осуществляется на уровне транскрипции и трансляции. При измерении скоростей распада мРНК было установлено, что по крайней мере в ряде бактериальных оперонов деградация мРНК может начинаться раньше, чем завершается ее синтез (<sup>1-4</sup>). Учитывая сопряженность процессов транскрипции, трансляции и деградации, можно думать, что в бактериальной клетке ни в один из моментов ее жизни не может быть полных молекул мРНК. Действительно, в случае триптофанового оперона *E. coli* показано, что пакет рибосом покрывает лишь 40% длины оперона, тем самым обеспечивая сохранность кусков мРНК, составляющих около 40% ее полной длины (<sup>5</sup>). Неясно, является ли такая картина общим правилом или справедлива лишь при транскрипции таких больших оперонов, как триптофановый.

Целью настоящей работы было выяснить, существуют ли в бактериальных клетках полные молекулы мРНК щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1). Полноценность молекул мРНК можно выявить, в частности, по их способности направлять синтез полных молекул соответствующего белка *in vitro*. Мы провели сравнительное исследование полноценности щелочной фосфатазы, синтезированной *in vitro* как на образованных *in vivo* полисомах, так и на РНК-матрицах. Щелочная фосфатаза в качестве объекта исследования была выбрана потому, что в состав оперона этого белка, по-видимому, входит лишь один структурный ген фосфатазы (<sup>6, 7</sup>), который имеет относительно небольшую (около 1200 нуклеотидов) длину. Дохан и др. сообщили об осуществлении синтеза фосфатазы *in vitro* на РНК-матрицах, выделенных из клеток *E. coli*, конститутивно синтезирующих щелочную фосфатазу (<sup>8, 9</sup>). В этой работе о полноценности синтезированной фосфатазы судили по совпадению профилей элюции ферментативной активности нативной и радиоактивности синтезированной *in vitro* фосфатаз при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Однако разделение полипептидов при ДЭАЭ-хроматографии недостаточно эффективно, так что неясно, наблюдали ли авторы синтез действительно полных полипептидов фосфатазы. При проведении наших исследований были использованы более совершенные методы разделения полипептидов. Материал, полученный после синтеза *in vitro*, очищали на ДЭАЭ-целлюлозе, как это делали Дохан и др., а затем разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ). Следует отметить, что в ходе работы особое внимание было уделено сохранению нативности препаратов полимерной РНК. РНК выделяли в максимально мягких условиях двумя методами: по Сальсеру (<sup>10</sup>) и по Монье (<sup>11</sup>). В контрольных экспериментах РНК, выделенная этими двумя методами из клеток *E. coli* штамм В, зараженных фагом Т<sub>4</sub>, в условиях нашей системы белкового синтеза направляла синтез ферментативно активного фагового лизоцима.

Полипептиды щелочной фосфатазы синтезировали в бесклеточной системе белкового синтеза *E. coli* в присутствии суммарных полирибосом или полимерной РНК, выделенных из клеток *E. coli* С<sub>4</sub> (P<sup>+</sup>, R<sub>1</sub><sup>+</sup>, R<sub>2</sub><sup>-</sup>), консти-

тутивно синтезирующих щелочную фосфатазу. Условия культивирования клеток, методы выделения полирибосом и получения грубого экстракта S-30, состав бесклеточной системы, а также условия проведения белкового синтеза мало отличались от общепринятых и подробно описаны нами ранее (12). Полипептиды метили по  $\text{H}^3$ -аланину с удельной активностью 24,8 С/ммол, который был синтезирован в лаборатории Н. Ф. Мясоедова Института атомной энергии им. И. В. Курчатова.

Синтезированные *in vitro* полипептиды фосфатазы превращали в присутствии избытка мономеров нативной фосфатазы в ферментативно активные димеры по методу (13) и подвергали многостадийной очистке, как описано в (9, 12): температурная (80°, 20 мин.) и проназная (300 мкг/мл, 37°, 5 час.) обработки, гель-фильтрация на сефадексе G-50 и двойная хроматография на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой в градиенте 0–0,4 М NaCl. При заключительной элюции с ДЭАЭ-колонки в каждой фракции градиента была определена, как в (12), радиоактивность и фосфатазная активность.

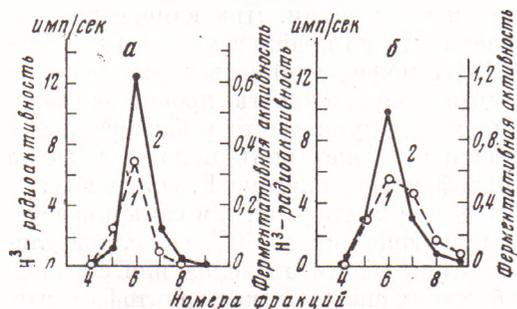


Рис. 1. Элюция с ДЭАЭ-целлюлозы димеров нативной и синтезированных *in vitro* на полирибосомах (а) и на РНК-матрицах (б) *E. coli*  $\text{C}_4$   $\text{H}^3$ -полипептидов щелочной фосфатазы. 1 —  $\text{H}^3$ -радиоактивность, 2 — ферментативная активность (отн. ед.). То же и на рис. 2

На рис. 1 приведены результаты заключительной элюции с ДЭАЭ-целлюлозы материала, синтезированного *in vitro* как на РНК-матрицах, так и на полирибосомах. Можно видеть, что в обоих случаях наблюдается совпадение профиля радиоактивности синтезированного материала с профилем фосфатазной активности. Полученные результаты, совпадающие с наблюдениями Дохана и др., показывают, что как РНК-матрицы, так и полирибосомы, выделенные из клеток конститутивного мутанта, направляют *in vitro* синтез полипептидов щелочной фосфатазы.

Такие полипептиды не синтезируются при внесении в систему препаратов РНК или полирибосом, выделенных из штаммов *E. coli*, несущих делецию в области структурного гена фосфатазы ( $\text{E}_{15}$ ,  $\text{C}_{30}\text{F}_{93}$ ). Однако при электрофоретическом разделении синтезированных *in vitro* полипептидов фосфатазы была установлена их неоднородность. Материал, очищенный хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе, разделяли электрофорезом (20 в/см., 45 мин.) в 7,5% ПААГ (15). После проведения электрофореза в 0,02 М трис-НСl-буфере, рН 8,0 (20 в/см., 45 мин.) столбик геля разрезали на 40 частей. Пептидный материал из каждой порции геля извлекали электрофорезом в конечный объем 0,25 мл, и в каждой фракции была определена фосфатазная активность и радиоактивность. Полученные результаты при-



Рис. 2. Распределение фосфатазной активности и радиоактивности при электрофорезе в ПААГ препарата фосфатазы, синтезированного *in vitro* на полирибосомах (а) и на РНК-матрицах (б)

ведены на рис. 2. Анализ этих результатов показывает, что на полисомах *in vitro* синтезируются полноценные молекулы щелочной фосфатазы. Действительно, в ходе электрофореза часть внесенной в трубку геля радиоактивности локализуется там же, где и нативная фосфатаза: наблюдается хорошее совпадение пиков фосфатазной активности и радиоактивности (рис. 2а). Однако в исследуемом препарате фосфатазы присутствуют также компоненты, обладающие большей электрофоретической подвижностью, чем нативная фосфатаза. Эти вещества в ходе электрофореза распределяются вдоль трубки с гелем, а за 90 мин. электрофореза практически полностью покидают трубки с гелем.

Полипептидный материал, синтезированный *in vitro* на РНК-матрицах, совсем не содержит полноценных полипептидов фосфатазы. Действительно, на рис. 2б можно видеть, что в этом случае в месте локализации в геле фосфатазной активности радиоактивность практически отсутствует. Вся радиоактивность препарата обусловлена веществами, имеющими большую электрофоретическую подвижность, чем нативная фосфатаза. За 45 мин. электрофореза большая часть радиоактивности препарата покидает трубки с гелем.

Таким образом, сравнительное изучение препаратов фосфатазы, синтезированной *in vitro* на РНК-матрицах и на полисомах, показало, что только на полисомах синтезируются полные пептидные цепи белка. При этом синтезируются также полипептиды, обладающие некоторыми свойствами фосфатазы, но отличающиеся от нее по электрофоретическим показателям. На РНК-матрицах же *in vitro* синтезируются только такие полипептиды.

Можно думать, что эти полипептиды являются неполноценными полипептидами щелочной фосфатазы. Действительно, кажется маловероятным, что это полипептиды нефосфатазной природы, сохроматографирующиеся с нативной фосфатазой при ДЭАЭ-хроматографии, так как такие полипептиды не синтезируются *in vitro* на препаратах полисом или РНК-матриц, выделенных из штаммов *E. coli*, несущих делецию в структурном гене фосфатазы. Мы попытались очистить синтезированный *in vitro* препарат фосфатазы от  $H^3$ -полипептидов с большей электрофоретической подвижностью посредством обработки его 8М мочевиной с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-100, а также дополнительной обработкой протеазами. Но и эти процедуры не обеспечили разделения фосфатазы и  $H^3$ -полипептидов с большей электрофоретической подвижностью.

Таким образом, *in vitro* синтезируются  $H^3$ -полипептиды, которые, по-видимому, являются фрагментами полипептидных цепей щелочной фосфатазы. Такие полипептиды синтезируются только при внесении в бесклеточную систему полирибосом или РНК-матриц, выделенных из штамма *E. coli* C<sub>4</sub>, конститутивно синтезирующего щелочную фосфатазу, и не синтезируются ни на полирибосомах, ни на РНК из штаммов с делецией по фосфатазе. Эти полипептиды, видимо, достаточно длинны, так как обладают рядом свойств нативной фосфатазы, например способностью комплектовать с субъединицами нативной фосфатазы с образованием димеров, устойчивых к действию высоких температур и протеолитических ферментов и не отличающихся от нативного фермента по хроматографическим показателям. Только электрофорез в ПААГ позволяет отделить эти полипептиды от нативного фермента.

Аналогичные результаты были получены при изучении синтеза *in vitro* бактериальной триптофаназы (<sup>16</sup>, <sup>17</sup>).

Обнаруженные неполные полипептиды фосфатазы могли возникнуть либо в результате синтеза на неполноценных молекулах мРНК фосфатазы, либо вследствие ошибок работы самой бесклеточной системы белкового синтеза. Предпринятые нами меры осторожности при выделении и работе с препаратами полимерной РНК (РНК выделяли двумя различными методами в максимально мягких условиях, грубые экстракты S-30 получали из штамма *E. coli* MRE-600, не содержащего РНКазу I), а также контрольные

эксперименты по успешному синтезу *in vitro* фагового лизоцима на препаратах РНК, выделенных в аналогичных условиях, позволяют думать, что мы имеем дело не с артефактом. Видимо, синтез таких неполноценных полипептидов фосфатазы обусловлен неполноценностью самих РНК-матриц, присутствующих в бактериальных клетках.

Таким образом, полученные нами результаты о синтезе *in vitro* на РНК-матрицах только неполноценных полипептидов фосфатазы позволяют думать, что в бактериальной клетке практически нет полных молекул мРНК фосфатазы, во всяком случае, их нет в количествах, которые можно было бы выявить, используя бесклеточную систему белкового синтеза. Обнаруженный нами синтез как полноценных, так и неполноценных полипептидов фосфатазы *in vitro* на полирибосомах можно объяснить, учитывая сопряженность протекания в бактериальной клетке процессов транскрипции, трансляции и деградации мРНК, а также тот факт, что все эти процессы идут в направлении от 5'- к 3'-концу нуклеотидной цепи. Образование полноценных полипептидов, по-видимому, обусловлено рибосомами, входящими в полисомы, содержащие матрицы с завершённым 3'-концом и деградированным 5'-концом мРНК фосфатазы. Этими рибосомами деградированный 5'-конец мРНК уже транслирован, а *in vitro* происходит достройка пептидов на той части полисомной мРНК, которая содержит нативный 3'-конец. Разрушение таких полирибосом в процессе выделения РНК сопровождается появлением в препарате фрагментов РНК, не содержащих 5'-конца оперона фосфатазы и неспособных поэтому направлять синтез белка. Однако в популяции полирибосом, вероятно, присутствуют как полисомы, содержащие мРНК фосфатазы с нативным 5'-концом и незавершённым 3'-концом, так и полирибосомы, несущие отрезки мРНК фосфатазы без нативных 3'- и 5'-концов. В первом случае *in vitro* фрагменты мРНК будут направлять синтез неполных полипептидов фосфатазы.

Авторы выражают благодарность А. А. Богданову за участие в обсуждении настоящей работы.

Институт атомной энергии  
им. И. В. Курчатова  
Москва

Поступило  
8 II 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. O. R. Kaempfer, B. Magasanik, J. Mol. Biol., v. 27, 453 (1967). <sup>2</sup> L. H. Hartwell, B. Magasanik, J. Mol. Biol., v. 10, 105 (1964). <sup>3</sup> J. P. Bilezikian, R. O. R. Kaempfer, B. Magasanik, J. Mol. Biol., v. 27, 495 (1967). <sup>4</sup> T. Schwarz, E. Graid, D. Kennel, J. Mol. Biol., v. 54, 299 (1970). <sup>5</sup> D. E. Morse, R. Mosteller et al., Nature, v. 223, 40 (1969). <sup>6</sup> H. Echols, A. Garen et al., J. Mol. Biol., v. 3, 40 (1961). <sup>7</sup> A. Garen, H. Echols, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., v. 48, 1398 (1962). <sup>8</sup> F. C. Dohan, R. H. Rubman, A. Torriany, J. Mol. Biol., v. 58, 469 (1971). <sup>9</sup> F. C. Dohan, R. H. Rubman, A. Torriany, Cold. Spring Harb. Symp. on Quant Biol., v. 34, 769 (1969). <sup>10</sup> W. Salser, R. F. Gesteland, A. Bolle, Nature, v. 215, 588 (1967). <sup>11</sup> R. Monier, S. Naono et al., J. Mol. Biol., v. 5, 311 (1962). <sup>12</sup> А. Н. Пекеш, Л. Ф. Лудеман и др., Молек. биол., № 3 (1974). <sup>13</sup> M. J. Schlessinger, R. Olsen, Anal. Biochem., v. 36, 86 (1970). <sup>14</sup> L. Ornstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, 321 (1964). <sup>15</sup> B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, 404 (1964). <sup>16</sup> S. A. M. K. Bashir, J. H. Parish, M. Brown, Biochem. J., v. 123, 355 (1971). <sup>17</sup> J. H. Parish, S. A. M. K. Bashir et al., Biochem. J., v. 125, 643 (1971).