

МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА, ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ
РЕВОЛЮЦИИ И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

На правах рукописи

КУБАРЕНКО АНДРЕЙ ВАЛЕРИЕВИЧ

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ДОМЕНА IV
ЭЛОНГАЦИОННОГО ФАКТОРА G И СПИРАЛИ 34 16S рРНК В
ПРОЦЕССЕ ТРАНСЛОКАЦИИ НА РИБОСОМАХ *Escherichia coli***

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Москва – 2003 г.

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и в Институте молекулярной биологии университета города Виттен (Германия).

Научные руководители: д.х.н., проф. Донцова Ольга Анатольевна
к.х.н., доц. Сергиев Петр Владимирович

Официальные оппоненты: д.х.н., проф. Тишков Владимир Иванович
д.х.н., проф. Готтих Борис Павлович

Ведущая организация: Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Защита состоится 25 ноября 2003 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, лабораторный комплекс "А", аудитории 501.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 20 октября 2003 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рибосома является сложным рибонуклеопротеидным комплексом живой клетки, который синтезирует белок, используя в своей работе аминоксил-тРНК и считывая информацию с мРНК. Биосинтез белка является сложным химико-биологическим процессом, на разных стадиях которого с рибосомой взаимодействуют различные факторы трансляции, причем взаимодействие происходит строго определенным образом и с определенными участками рибосомы. Одним из важных процессов в цикле трансляции является транслокация, т.е. перемещение комплекса мРНК-тРНК в рибосоме на один кодон. Этот процесс катализируется элонгационным фактором G (EF-G). В ходе транслокации EF-G взаимодействует с обеими субчастицами рибосомы (30S и 50S). Накоплено много данных о взаимодействии EF-G с 50S субчастицей, однако, молекулярный механизм активации ГТФ-азы EF-G до сих пор неизвестен. Данных о взаимодействии EF-G с 30S субчастицей накоплено немного. Известно, что одним из элементов 30S субчастицы, играющим важную роль в транслокации, является спираль 34 16S рРНК. В данной работе была изучена роль домена IV EF-G и спирали 34 16S рРНК в механизме транслокации мРНК и тРНК на 30S субчастице, а также проведен поиск протонированных нуклеотидов 23S рРНК, которые могут принимать участие в работе функционально важных центров 50S субчастицы.

Цель работы:

1. Поиск контакта домена IV EF-G с 30S субчастицей рибосомы с помощью нового варианта метода фотоаффинного химического сшивания компонентов аппарата трансляции;
2. Исследование влияния важных для транслокации нуклеотидов спирали 34 16S рРНК на функционирование рибосомы *in vitro* на разных этапах трансляции с помощью сайт-направленного мутагенеза этих нуклеотидов;
3. Изучение влияния мутаций в спирали 34 16S рРНК на точность трансляции *in vivo*;
4. Исследование влияния мутаций в спирали 34 16S рРНК на структуру декодирующего центра и всей 30S субчастицы с помощью химического пробинга;
5. Поиск в рРНК протонированных оснований, имеющих функциональное значение, с помощью нового метода определения протонированных оснований в РНК.

Научная новизна и практическая значимость. Контакты домена IV EF-G с 30S субчастицей *Escherichia coli* исследовали с помощью нового варианта метода фотоаффинного химического сшивания, разработанного в настоящей работе. Этот метод позволяет сайт-специфически вводить фотометку на поверхность домена IV EF-G. О контактах домена IV с компонентами 30S субчастицы можно судить по образованию сшивок. Было показано, что домен IV EF-G контактирует с элементами 30S субчастицы. Разработанный вариант метода фотоаффинного химического

сшивания может быть применен для исследования пространственного окружения белков в различных рибонуклеопротеидных комплексах.

Для исследования участия спирали 34 16S рРНК в процессах трансляции, в частности, в транслокации, в настоящей работе методами сайт-направленного мутагенеза заменяли ряд нуклеотидов. Выбор мест мутаций производили на основании данных о консервативности этих нуклеотидов, защитах их от химической модификации и расположению в третичной структуре 30S субчастицы. Таким образом, нарушали природные контакты внутренних элементов спирали 34, а также контакты спирали 34 с другими элементами 30S субчастицы.

Для анализа фенотипа полученных мутантов измеряли скорость роста клеток, точность трансляции *in vivo* и изучали протекание отдельных этапов трансляции *in vitro*. В работе использовали спектр кинетических методов, позволяющих исследовать как стационарную, так и престаационарную кинетику. Подходы престаационарной кинетики (например, метод остановленного потока) позволяют получить информацию об элементарных стадиях механизма функционирования рибосомы на разных этапах трансляции.

В работе был получен ряд мутаций в спирали 34 16S рРНК, оказавшихся нелетальными для клетки. Такие мутантные рибосомы были выделены в чистом виде, без примеси рибосом дикого типа, и исследованы биохимическими и кинетическими методами *in vitro*.

С помощью химического пробинга было установлено, что мутации в спирали 34 влияют как на локальную структуру декодирующего центра, так и на структуру участков 30S субчастицы, важных для ее взаимодействия с 50S субчастицей.

Таким образом, в работе был применен комплексный подход, основанный на методах определения точности трансляции *in vivo* и *in vitro*, а также различных вариантах химического пробинга структуры РНК, позволяющих исследовать роль нуклеотидов рРНК в функционировании рибосомы. Этот подход может быть успешно использован для исследования широкого круга рибонуклеопротеидных комплексов и его разработка является важным этапом в развитии методов изучения процессов трансляции.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на следующих конференциях: VII Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам Ломоносов-2000, Москва, Россия, 2000 г.; Международная конференция "Trends In Nucleic Acid Chemistry", Москва, Россия, 2000 г.; Международная конференция, посвященная юбилею А.С.Спирина, "Синтез белка", Пущино, Россия, 2001 г.; Международная конференция "The Dynamics of Ribosome Structure and Function", Квинстаун, Новая Зеландия, 2002 г.; 6-я Международная конференции памяти В.А. Энгельгардта по молекулярной биологии, Москва, Россия, 2003.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы, выводы. Материал иллюстрирован 74 рисунками и 14 таблицами. Библиографический указатель включает 211 цитированных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Биосинтез белка является сложным химико-биологическим процессом, на разных стадиях которого с рибосомой взаимодействуют различные факторы трансляции, причем взаимодействие происходит строго определенным образом и с определенными участками рибосомы. Некоторые из этих факторов принадлежат к классу G-белков. Их функционирование сопровождается гидролизом GTP, при этом происходит образование GDP и неорганического фосфата P_i . При взаимодействии факторов с рибосомой эта реакция значительно ускоряется.

ГТФ-азы, которые участвуют в трансляции, взаимодействуют с рибосомой на всех этапах биосинтеза белка. Инициаторный фактор 2 (IF2) катализирует связывание инициаторной fMet-тРНК^{fMet} с Р участком рибосомы и дальнейшее связывание 50S субчастицы с 30S инициаторным комплексом. Элонгационный фактор Tu (EF-Tu) отвечает за доставку очередной аминоацил-тРНК в А участок рибосомы, а элонгационный фактор G (EF-G) катализирует перемещение комплекса мРНК-тРНК в рибосоме на один кодон. В свою очередь, фактор терминации 3 (RF3) катализирует освобождение из рибосомы фактора терминации 1 или 2 (RF1 или RF2) после гидролиза пептидил-тРНК в процессе терминации.

До сих пор неизвестен механизм активации ГТФ-азы G-белков, участвующих в процессе трансляции. Однако тот факт, что активация происходит при связывании факторов с рибосомой, позволяет предположить, что рибосома играет важную роль в катализе ГТФ-азной активности факторов трансляции. Исследования показали, что все ГТФ-азы взаимодействуют с рибосомой в одном общем или, по крайней мере, перекрывающихся участках, что, безусловно, справедливо для EF-Tu и EF-G. Следовательно, для рибосомы важной задачей является регуляция и координация связывания и освобождения различных факторов трансляции, при этом рибосома так же катализирует гидролиз GTP на некоторых из них. Эта сложная задача, по всей видимости, достигается при помощи передачи сигнала между различными функциональными центрами рибосомы, что часто бывает связано со значительными структурными перестройками в ней. Данная работа направлена на изучение роли домена IV EF-G и участия спирали 34 16S рРНК в механизме транслокации мРНК-тРНК на 30S субчастице, а также определение роли протонированных оснований рРНК в функционировании рибосомы.

1. Поиск контактов домена IV EF-G с 30S субчастицей

Согласно биохимическим данным и данным криоэлектронной микроскопии, основные участки взаимодействия EF-G с рибосомой находятся на 50S субчастице. Два участка 23S рРНК контактируют с EF-G: район связывания тиострептона (область нуклеотида 1070) и α -сарциновая петля (область нуклеотида 2660). Домен IV фактора EF-G направлен в сторону декодирующего центра 30S субчастицы и, как свидетельствуют данные криоэлектронной микроскопии и результаты химического футпринтинга, может с ним взаимодействовать. Для выявления контактов между EF-G с малой субчастицей рибосомы представляется целесообразным вводить фотоаффинный реагент в домен IV фактора. Для модификации фактора фотоаффинным реагентом использовали ряд мутантных белков, в которых три природных остатка цистеина были заменены на аланин. Кроме того, в каждом из них один из аминокислотных остатков 506, 541, 585 или 591, расположенных на поверхности домена IV, был заменен на цистеин.

В работе использовали два фотоаффинных реагента: п-азидофенацилбромид (APAB) и 3-(3-(йодоацетиламино)фенил)-3-(трифторметил) диазирин (TDI). После реакции модификации EF-G очищали от избытка реагента. Выход модификации определяли с помощью реакции свободных SH-групп с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислотой) (DTNB). Функциональную активность EF-G после модификации фотореагентами проверяли с помощью пуромицинового теста. Оказалось, что при введении фотореакционной группы функциональная активность факторов элонгации не изменялась. Помимо белков дикого типа в работе использовали белки, содержащие на N-конце участок фосфорилирования протеинкиназой A, необходимый для дальнейшего анализа сшивок.

К модифицированному APAB или TDI EF-G добавляли GTP и антибиотик тиострептон или фусидовую кислоту. Для получения функционального рибосомного комплекса с EF-G использовали претранслокационный комплекс рибосомы с мРНК, пептидил-тРНК и деацелированной тРНК. К этому комплексу добавляли модифицированный APAB или TDI EF-G. Детектируемый выход сшивки наблюдали для комплексов, образованных в присутствии тиострептона.

Пришивки EF-G к рибосомным белкам анализировали с помощью ультрацентрифугирования и электрофореза. Для анализа продуктов сшивания после облучения в EF-G вводили радиоактивную метку с помощью γ -[³²P]-АТФ и протеинкиназы А. Кроме того, проводили детекцию с помощью антител к EF-G. Было обнаружено присутствие EF-G во фракциях 30S субчастиц после активации фотометки, что свидетельствует о сшивке EF-G с компонентами малой субчастицы рибосомы. При этом EF-G совыделялся как с 16S рРНК, так и с белками малой субчастицы. Выход сшивки был больше при использовании EF-G с модифицированными аминокислотными остатками 506 и 591 и меньше – в случае остатков 541 и 585.

Следует отметить, что во всех случаях выход реакции фотоаффинного химического сшивания был недостаточным для полной идентификации продуктов сшивки. Это может быть связано с лабильностью комплекса, который EF-G образует с малой субчастицей рибосомы. Можно предположить, что их взаимодействие происходит как серия транзитных контактов, причем на разных этапах в нем могут принимать участие как различные рибосомные белки, так и различные участки 16S рРНК. Это приводит к тому, что, хотя в целом выход реакции сшивания с 30S субчастицей достаточно высок, идентифицировать конкретных участников сшивки на малой субчастице не удастся, поскольку на разных этапах сшивки образуется с разными ее компонентами. Наши данные свидетельствуют о наличии контакта домена IV фактора EF-G с малой субчастицей рибосомы в процессе транслокации. Видимо, EF-G вызывает конформационные изменения в малой субчастице рибосом, что облегчает процесс транслокации.

2. Введение мутаций в спираль 34 16S рРНК и изучение влияния этих мутаций на различные стадии процесса трансляции *in vitro*

Итак, нами было показано, что EF-G взаимодействует с компонентами малой субчастицы, причем, как с белками, так и с 16S рРНК. Известно, что спираль 34 играет важную роль в процессе транслокации. Со спиралью 34 связывается антибиотик спектиномицин, который ингибирует транслокацию. Защита от химической модификации оснований 1054 и 1201 в спирали 34 происходит только в рибосомных комплексах с EF-G, т.е. совпадает с протеканием процесса транслокации. Мутации нуклеотидов 1054, 1057, 1058, 1199 и 1200 16S рРНК существенно влияют на рост клеток за счет ошибочной терминации, уменьшения точности синтеза белка и увеличения частоты сдвига рамки считывания.

Для введения мутаций было выбрано два нуклеотида в спирали 34 – A1191 и A1201; один нуклеотид в петле между спиралями 34, 35 и 38 – C1109; и один нуклеотид в спирали 31 – U961 (рисунок 1).

C1109 является высоко консервативным только в пределах одного царства. В литературе было предсказано, что он образует третичный контакт с парой G933-C1384, которая находится в районе шеи 30S субчастицы, но в третичной структуре 30S субчастицы подобного контакта не обнаружили. Однако, такой третичный контакт может образовываться в переходных состояниях во время процесса трансляции и играть важную роль для стабилизации переходных состояний. Для проверки данного предположения было решено заменить нуклеотид C1109 на A, G или U и исследовать, как такая замена будет влиять на прохождение различных стадий трансляции.

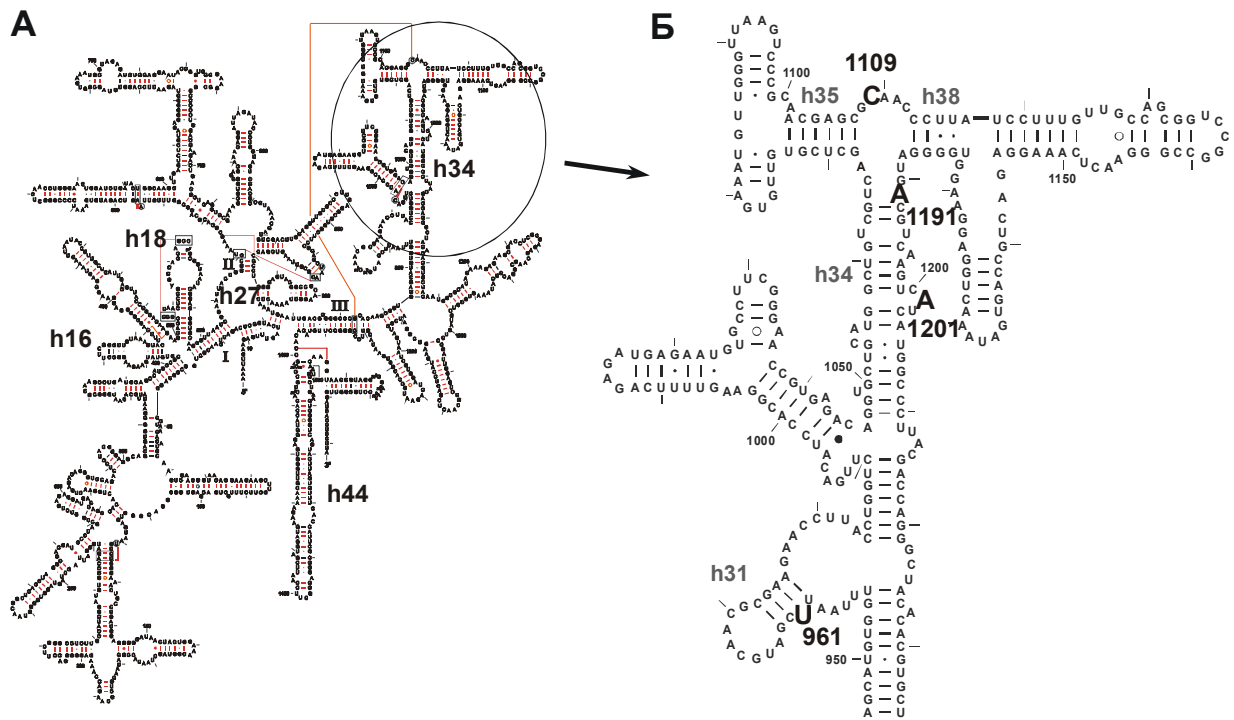


Рисунок 1. А. Вторичная структура 16S рРНК *E.coli*. Отмечены спирали 16 (h16), 18 (h18), 27 (h27), 34 (h34) и 44 (h44). Б. Район спирали 34 с выделенными нуклеотидами, по которым вводились мутации.

A1201 не является консервативным. По данным Винтермаера и сотр. при связывании EF-G происходит изменение доступности A1201 для химической модификации. В кристаллической структуре он образует две водородные связи с нуклеотидом U961, который во вторичной структуре, как было предсказано, образует обычную Уотсон-Криковскую пару с A974. Нуклеотид U961 является очень консервативным и, согласно рентгеноструктурному анализу, образует с A974 одну водородную связь. Образование такого третичного контакта в триplete A1201-U961-A974 может быть важным для функционирования декодирующего центра 30S субчастицы в процессе транслокации. Для проверки функциональной значимости данных контактов было решено создать три мутанта. В двух из них замены A1201 на U и U961 на A должны привести к нарушению контактов в этом триplete и, как следствие, изменению функциональной активности таких рибосом. В третьем двойная мутация A1201U/U961A должна привести к восстановлению контактов этих нуклеотидов и, как следствие, к нормальному функционированию рибосом.

Третьим местом введения мутации является нуклеотид A1191. Он высоко консервативен и находится в структуре 16S рРНК в районе, в котором сходятся спирали 34, 35 и 38, а также связывается антибиотик спектиномицин. Он образует несколько водородных связей и, скорее всего, важен для стабилизации структуры как декодирующего центра, так и всей 30S субчастицы. Было решено заменить нуклеотид A1191 на C, G или U.

Мутации в 16S рРНК вводили с помощью сайт-направленного мутагенеза по методу Кункеля. Для этого была использована одноцепочечная урацилсодержащая ДНК фага

M13, несущая ген 16S рРНК. После мутагенеза ген 16S рРНК с мутацией переклонировали в плазмиду рSTL102, содержащую рибосомный оперон *rnmB* и получили серию плазмид рSTLxxxx, где xxxx – обозначение соответствующей мутации. Были получены восемь плазмид серии рSTLxxxx – рSTLC1109A/U961A, рSTLC1109G, рSTLA1191C, рSTLA1191G, рSTLA1191U, рSTLA1201U, рSTLU961A и рSTLA1201U/U961A.

Для получения популяции рибосом, содержащих только мутантную 16S рРНК без примеси 16S рРНК дикого типа, использовали $\Delta 7$ штамм (MC250), в котором делетированы все семь рибосомных оперонов. Плазмидами, несущими мутации, в этом штамме замещали исходную *rnm* плазмиду, являющуюся единственным источником

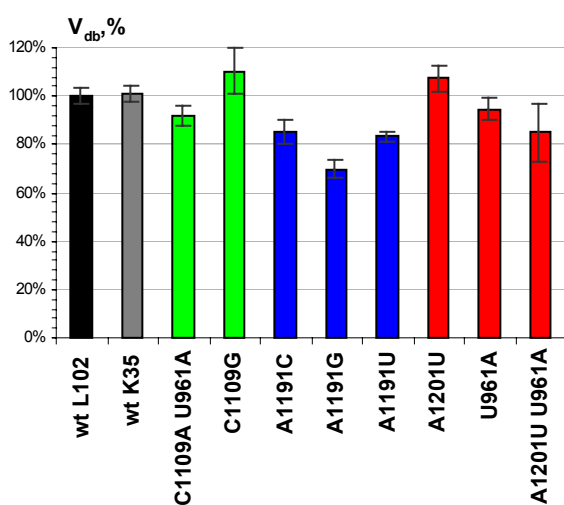


Рисунок 2. Относительные скорости роста клеток штамма MC250-pSTLxxxx.

рРНК в $\Delta 7$ штамме. В качестве контролей использовали штамм MC250, трансформированный плазмидой рSTL102 или рLK35, несущей немутированный рибосомный оперон. Для всех полученных штаммов были определены времена удвоения клеток, а также рассчитаны относительные скорости роста (величина обратная времени удвоения, нормированная на скорость роста штамма MC250-pSTL102, рисунок 2). Видно, что в случае мутации A1191G клетки растут медленнее всего.

При выделении рибосом, несущих мутацию A1191G, оказалось, что в условиях стандартного выделения рибосом (5.25 мМ Mg²⁺), 70S рибосомы полностью диссоциируют на 30S и 50S субчастицы. Для предотвращения диссоциации 70S рибосом все дальнейшие выделения проводили при концентрации Mg²⁺ равной 21 мМ как в буфере для лизиса клеток, так и в градиенте концентрации сахарозы. После выделения 70S рибосом или 30S субчастиц, гомогенность препарата рибосом/субчастиц определяли с помощью реакции обратной транскрипции (RT-анализа), который показал, что все выделенные образцы рибосом содержат только мутантные 30S субчастицы и не содержат 30S субчастиц дикого типа.

Для оценки влияния концентрации Mg²⁺ на степень ассоциации субчастиц образцы рибосом, содержащих мутантную 16S рРНК, анализировали с помощью ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы при различной концентрации Mg²⁺. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3. Видно, что больше всего нарушает ассоциацию субчастиц мутация A1191G. Так же в значительной степени на ассоциацию субчастиц влияют мутации C1109A/U961A, A1191U и U961A.

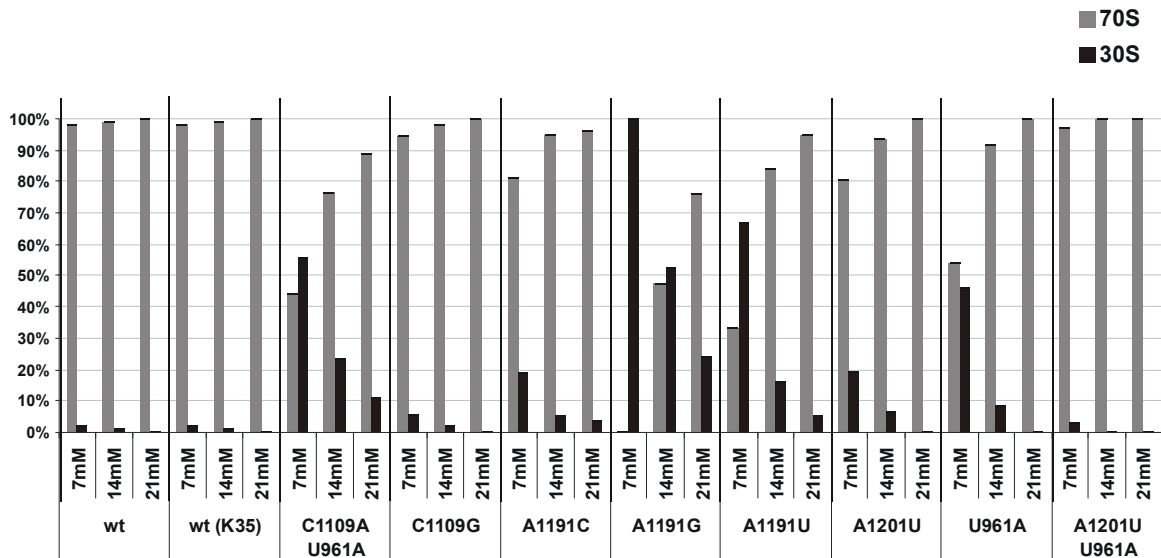


Рисунок 3. Зависимость степени диссоциации 70S рибосом от концентрации Mg^{2+} . Столбец серого цвета – доля 70S рибосом, столбец черного цвета – доля 30S субчастиц. wt – рибосомы дикого типа, выделенные из клеток *E.coli* MRE600.

Такое поведение мутантных рибосом может быть связано с тем, что мутации в спирали 34, с одной стороны, приводят к изменению структуры 30S субчастицы (например, меняется взаимное расположение головы и тела 30S субчастицы) и, как следствие, нарушению взаимодействия рибосомных субчастиц. С другой стороны, мутации могут влиять на локальную структуру одного или нескольких участков 30S субчастицы (16S рРНК), ответственных за контакт субчастиц, или декодирующего центра.

Следующим этапом работы была проверка способности мутантных рибосом образовывать инициаторный комплекс *in vitro*. Эффективность инициации проверяли при стандартной концентрации Mg^{2+} - 7 мМ (рисунок 4).

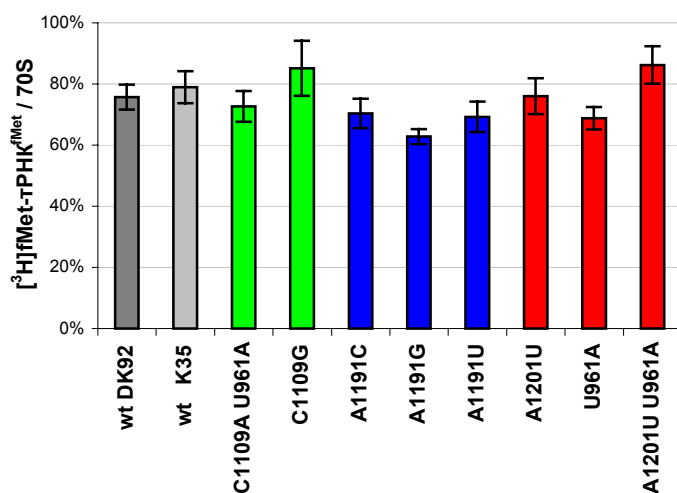


Рисунок 4. Эффективность инициации трансляции для различных мутантных рибосом при концентрации Mg^{2+} 7 мМ и времени инкубации 1 час.

Поскольку 70S рибосомы, несущие мутации C1109A/U961A, A1191U и U961A, диссоциировали при 7 мМ Mg^{2+} , а при увеличении концентрации ионов магния ассоциация субчастиц улучшалась, было решено проверить влияние концентрации Mg^{2+} на эффективность инициации. Максимум эффективности образования инициаторного комплекса для рибосом с мутациями A1191G, A1191U и U961A сдвинут в сторону более высокой концентрации Mg^{2+} (порядка 10 мМ). Полученные данные позволяют сделать вывод, что мутации не влияют на процесс

инициации как таковой. Уменьшение эффективности инициации на рибосомах с мутациями A1191G, A1191U и U961A при 7 мМ Mg^{2+} по сравнению с другими обусловлено диссоциацией 70S рибосом.

Мутации в спирали 34, с одной стороны, могут изменять локальную структуру декодирующего центра 30S субчастицы и тем самым влиять на связывание антикодонной шпильки aa-тРНК. С другой стороны, мутации в спирали 34 могут приводить к нарушению передачи сигнала от декодирующего центра 30S субчастицы к функционально важным участкам 50S субчастицы, с которыми происходит связывание EF-Tu и аминоацелированного конца aa-тРНК, и, как следствие, нарушать связывание всего тройного комплекса с рибосомой, стимуляцию ГТФ-азной активности EF-Tu или связывание освобожденной из комплекса с EF-Tu aa-тРНК.

Эффективность связывания aa-тРНК с А участком рибосомы определяли по образованию дипептида. Если связывание и позиционирование aa-тРНК на рибосоме происходит правильным образом, то аминоацелированный конец тРНК располагается в пептидилтрансферазном центре таким образом, что становится возможным образование пептидной связи. Как оказалось, образование пептидной связи происходит приблизительно с одинаковой эффективностью для всех мутантных рибосом и лишь незначительно хуже, чем для рибосом дикого типа. Следовательно, в мутантных рибосомах связывание аминоацелированного конца aa-тРНК в пептидилтрансферазном центре, функционирование пептидилтрансферазного центра и образование пептидной связи не затронуто мутациями. Важные данные о влиянии мутаций в спирали 34 16S рРНК на точность связывания aa-тРНК и функционирование декодирующего центра 30S субчастицы можно получить, проверяя связывание с А участком aa-тРНК, с частично некомплементарным кодоном мРНК антикодоном.

Проверку эффективности связывания с рибосомой aa-тРНК, третий нуклеотид антикодона которой некомплементарен соответствующему первому нуклеотиду кодона мРНК, проводили в модельной системе (рисунок 5). Некомплементарность третьего нуклеотида антикодона тРНК первому нуклеотиду кодона мРНК в этой системе моделировали, используя тРНК^{Phe} и две различные мРНК.

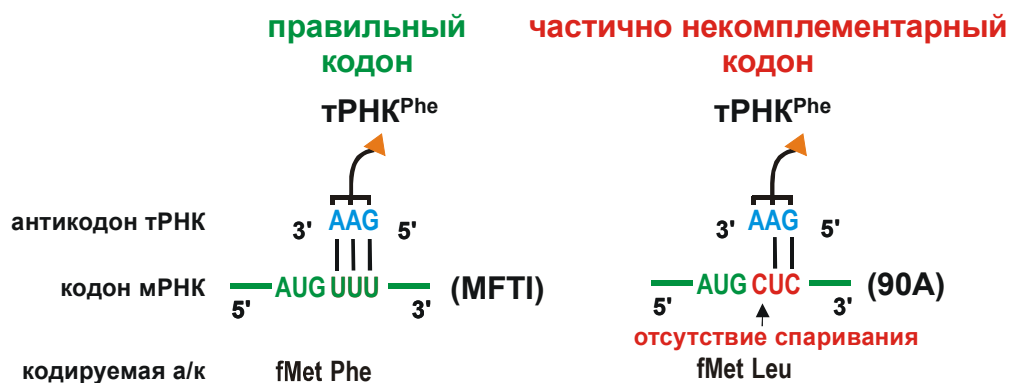


Рисунок 5. Образование дипептида в случае комплементарного и частично некомплементарного кодонов при связывании с А участком рибосомы, содержащей разные мРНК, [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}.

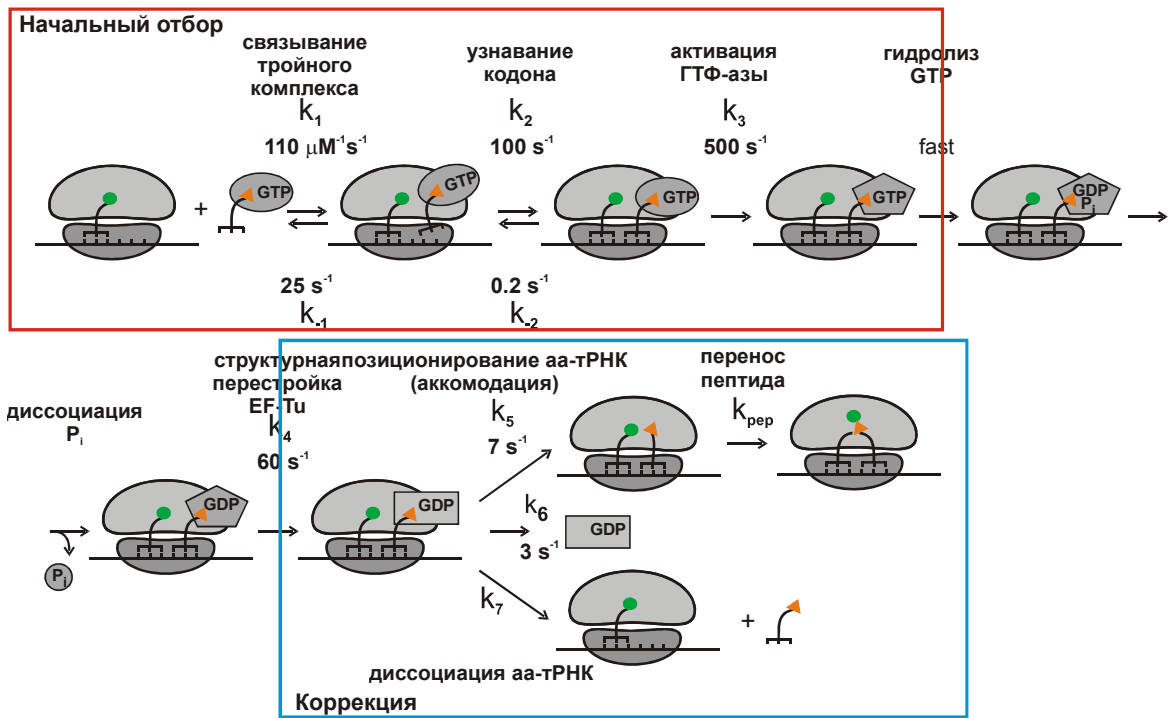


Рисунок 6. Кинетическая схема связывания aa-тРНК с А участком рибосомы (Rodnina et al. (2000) *Biol. Chem.* 381: 377-387).

Для рибосом с мутациями С1109А/У961А и А1191G уровень связывания aa-тРНК в случае частично некомплементарного кодона СUC в 1.5-2 раза выше, чем для других мутантных рибосом и рибосом дикого типа. Это говорит о том, что данные мутации влияют на точность трансляции на стадии связывания тройного комплекса EF-Tu с aa-тРНК с А участком рибосомы и узнавания правильной aa-тРНК (рисунок 6). Ранее, с помощью подходов стационарной кинетики было показано, что мутации не оказывают влияния на функционирование пептидилтрансферазного центра 50S субчастицы. Поскольку эти эксперименты проводили в условиях, когда нивелируются различия в начальном отборе различных aa-тРНК, полученные данные говорят о том, что в двух мутантах С1109А/У961А и А1191G затронута именно стадия аккомодации aa-тРНК в рибосоме. Однако, какой именно эффект вызывают эти мутации – локальное изменение структуры декодирующего центра 30S субчастицы или глобальное изменение структуры 30S субчастицы и нарушение передачи сигнала от 30S субчастицы к 50S субчастице – на основании этих данных сказать сложно. Для того, чтобы ответить на этот вопрос необходимо более детально исследовать различные стадии кинетической схемы связывания aa-тРНК с А участком рибосомы.

Для детального изучения влияния мутаций в спирали 34 16S рРНК на стадию начального отбора и коррекции при связывании aa-тРНК с А участком рибосомы применяли подход престаационарной кинетики – метод остановленного потока. Для регистрации протекания процесса в один из компонентов исследуемой системы, а именно в тРНК, вводили флуоресцентную метку (профлавин), по изменению сигнала которой можно следить за протеканием реакции.

Был проведен анализ престаионарной кинетики связывания тройного комплекса с А участком рибосом дикого типа и содержащих мутацию А1191G для кодона комплементарного (MFTI мРНК, AUG UUU) и частично некомплементарного (90А мРНК, AUG CUC) антикодону тРНК. Значения наблюдаемых констант приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения кинетических констант для связывания тройного комплекса с А участком для мутантных рибосом А1191G и рибосом дикого типа.

	A1191G		WT	
	MFTI мРНК AUG UUU	90A мРНК AUG CUC	MFTI мРНК AUG UUU	90A мРНК AUG CUC
$k_{app\ 2,3}$	50 ± 1	48 ± 1	32 ± 1	47 ± 2
$k_{app\ 7}$	3.2 ± 0.2	0.39 ± 0.07	6.5 ± 0.2	n/d

Наблюдаемые константы первых двух стадий $k_{app\ 2,3}$ (узнавания кодона и стимуляция ГТФ-азной активности, рисунок 6) в случае кодона комплементарного и частично некомплементарного антикодону aa-тРНК различаются незначительно для рибосом дикого типа и рибосом, содержащих мутацию А1191G. Кинетические же константы стадии аккомодации $k_{app\ 7}$ для этих двух случаев различаются почти на порядок. В тоже время, для связывания aa-тРНК с А участком на частично некомплементарном кодоне для рибосом дикого типа константу $k_{app\ 7}$ невозможно определить, так как на кинетической кривой в этом случае нет изменения сигнала, связанного с аккомодацией aa-тРНК в А участке. Комплекс aa-тРНК с рибосомой диссоциирует сразу после стадии начального связывания. При связывании же aa-тРНК с А участком рибосом, содержащих мутацию А1191G, в случае частично некомплементарного кодона, происходит медленная аккомодация aa-тРНК. Следовательно, в мутантных рибосомах А1191G затронута стадия аккомодации aa-тРНК в А участке. Этот факт хорошо согласуется с полученными ранее результатами по образованию дипептида на мРНК с комплементарным и частично некомплементарным кодонами для рибосом с мутацией А1191G, когда увеличение эффективности связывания “неправильной” aa-тРНК с А участком рибосомы, скорее всего, связано именно с нарушением стадии аккомодации aa-тРНК в рибосоме.

На следующем этапе работы проверяли влияние мутаций на транслокацию. При связывании с претранслокационным комплексом и в процессе транслокации EF-G контактирует как 30S, так и с 50S субчастицей рибосомы, поэтому логично предположить, что изменение локальной структуры декодирующего центра или нарушение передачи сигнала между субчастицами, вызванное мутациями в спирали 34, может повлиять на связывание EF-G с рибосомой и катализ им перемещения мРНК-тРНК. Для исследования процесса транслокации применяли два подхода – метод стационарной и престаионарной кинетики. В соответствии с кинетической схемой функционирования EF-G в процессе транслокации (рисунок 7) стадией, лимитирующей

скорость всего процесса транслокации, является переход рибосомы из состояния, в котором возможна транслокация (открытого состояния), в исходное состояние (рисунок 7, стадия 7). Эксперименты, проводимые с помощью подходов стационарной кинетики, позволяют определить, влияют ли мутации в спирали 34 16S рНК на эту стадию кинетической схемы процесса транслокации. Однако исследования, проведенные с помощью подходов стационарной кинетики, не выявили влияния мутаций на эту скоростьлимитирующую стадию транслокации.

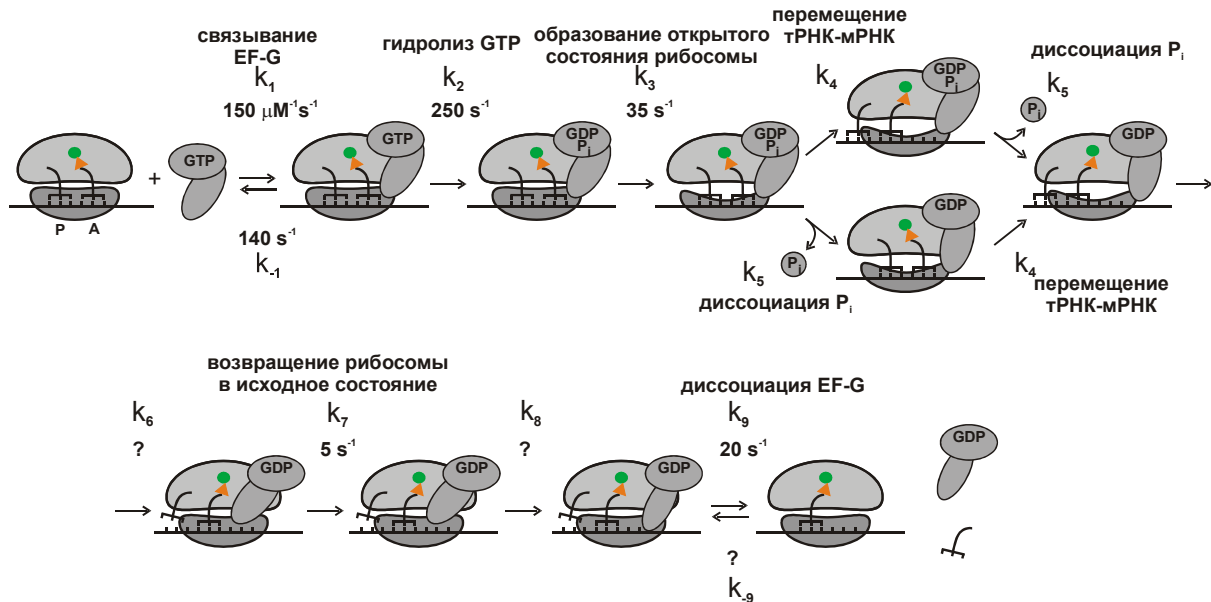


Рисунок 7. Кинетическая схема функционирования EF-G в процессе транслокации (Savelsbergh et al. (2003) *Mol. Cell* 11: 1517-1523).

Для более детального изучения влияния мутаций в спирали 34 16S рНК на различные стадии процесса транслокации были проведены кинетические исследования элементарного акта транслокации с помощью метода остановленного потока.

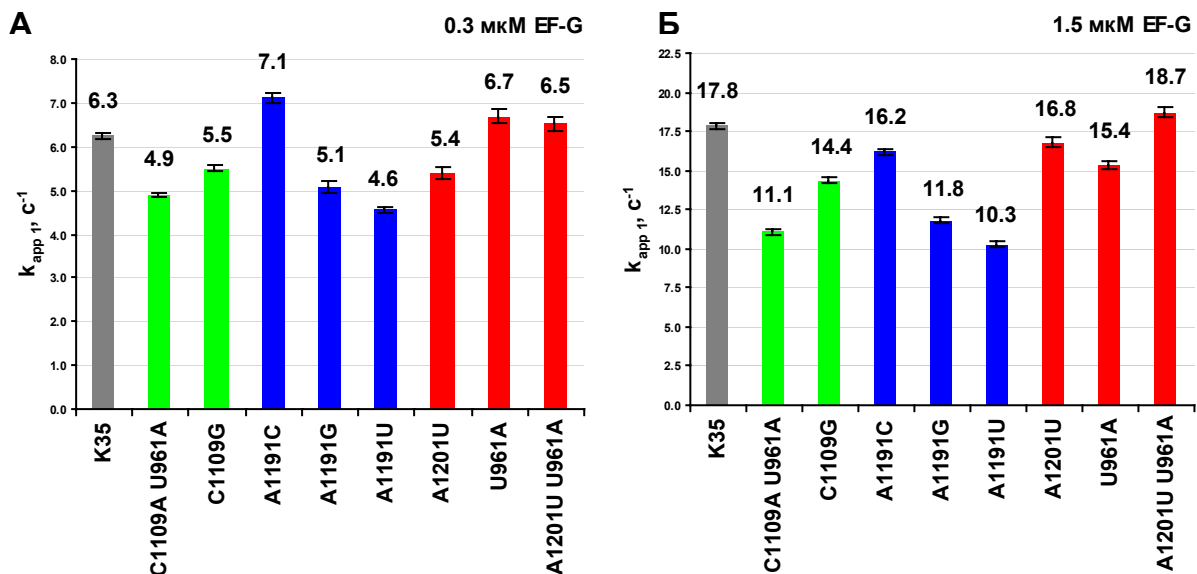


Рисунок 8. Значения кажущихся констант $k_{app 1}$ для двух концентраций EF-G – ненасыщающей (0.3 мкМ)(А) и насыщающей (1.5 мкМ)(Б).

Перемещение мРНК-тРНК, без которого невозможно связывание с рибосомой следующей аа-тРНК, является одной из важнейших стадий трансляции. Полученные кинетические данные говорят о том, что мутации С1109А/У961А, А1191G и А1191U не влияют на начальное взаимодействие EF-G с рибосомой, но замедляют структурную перестройку 30S субчастицы, которая предшествует перемещению мРНК-тРНК и соответствует переходу рибосомы в открытое состояние (рисунок 7). Проведенные ранее исследования первых стадий элонгации – связывания аа-тРНК с А участком рибосомы и образования дипептида – также показали, что мутации влияют на перестройку 30S субчастицы, а именно, декодирующего центра 30S субчастицы. Интересный эффект наблюдается при исследовании элементарного акта транслокации для мутантных рибосом А1201U, У961А и А1201U/У961А. При ненасыщающей концентрации EF-G (рисунок 8), в условиях, когда скорость транслокации мРНК-тРНК зависит от концентрации EF-G, транслокация на рибосомах с мутацией У961А происходит быстрее, чем на других мутантных рибосомах (А1201U и А1201U/У961А). При насыщающей же или близкой к ней концентрации EF-G (рисунок ИВ.29Б) скорость транслокации мРНК-тРНК уже не зависит от концентрации EF-G и, как полагают, определяется только структурными перестройками в самой рибосоме (в частности, в 30S субчастице). В этих условиях скорость транслокации для мутантных рибосом с заменой У961А становится меньше, чем для рибосом с мутациями А1201U и А1201U/У961А. Таким образом, образование и перестройка третичного контакта в триплете А1201U-У961А-А974 действительно важны для функционирования рибосомы.

3. Влияние мутаций в спирали 34 16S рРНК на точность трансляции *in vivo*

Для проверки точности трансляции, осуществляемой рибосомами, несущими мутации в спирали 34 16S рРНК, *in vivo* была применена система, основанная на экспрессии репортерного гена β -галактозидазы. В нашем распоряжении находился набор штаммов, содержащих плазмиды, которые кодируют ген *lacZ* с различными мутациями (таблица 2).

Образование полноразмерного активного белка при трансляции мРНК, несущей мутацию, возможно только тогда, когда происходит прочтение стоп-кодона (плазмиды рSG12-6, рSG853 и рSG^{3/4}) или сдвиг рамки считывания (плазмиды рSG12DP и рSGlac7). В случае мутации Е461Q, которая соответствует замене аминокислотного остатка в активном центре фермента, синтез активной β -галактозидазы возможен при включении в белок неправильной аминокислоты. Клетки штамма MC127 трансформировали плазмидами серии рSTLxxxx, кодирующими мутированный рибосомный оперон, и определяли в них активность β -галактозидазы.

Таблица 2. Плазмиды, кодирующие ген *lacZ* с различными мутациями. Жирным шрифтом выделены стоп-кодоны. Подчеркнутый CUG кодон является восьмым в гене *lacZ* дикого типа. Рамка считывания определена разделением на трехбуквенные кодоны. Позиции сдвига рамки считывания отмечены звездочкой *.

Плаزمида	Мутация	Последовательность
pSG25	wt <i>lacZ</i>	AUG AUU ACG CUA AGC UUG GCA <u>CUG</u>
pSG12-6	UAG	AUG AUU ACG CUA AGC UUU GUU UAG GCC GGC CCU AAU UCA <u>CUG</u>
pSG853	UAA стоп	AUG AUU ACG CUA AGC UUU GUC UAA GUU AGC GGC CCU AAU UCA CUG
pSG ^{3/4}	UGA	AUG AUU ACG CUA AGC UUA GGG UAU CUU UGA CUA CGA CGG AUC CCC GGG AAU UCA
pSG12DP	-1 FS	AUG AUU ACG CUA AGC UUG GG AU* AGG AUC CCC GGG AAU UCA <u>CUG</u>
pSGlac7	+1 FS	AUG AUU ACG CUA AGC UUU GUG U* AGG GUU AGC GGC CCU AAU UCA <u>CUG</u>
CSH103	E461Q	точная мутация в активном центре фермента

Результаты *in vivo* экспериментов по определению частоты сдвига рамки считывания показали (таблица 3), что для мутантов C1109A/U961A и A1191G чаще происходит -1 сдвиг рамки считывания, в то время как для других мутантов преобладает +1 сдвиг рамки считывания и прочтение стоп-кодонов.

Таблица 3. Влияние мутаций в спирали 34 16S рРНК на прочтение стоп-кодонов и сдвиг рамки считывания. Активность β-галактозидазы измеряли по методу Миллера. В каждом случае приведенная активность является средним значением, полученным в трех экспериментах. В каждом столбце активность β-галактозидазы нормирована по величине активности β-галактозидазы для рибосом дикого типа K35.

	Относительная активность β-галактозидазы						
	wt pSG25	E461Q CSH103	-1 FS pSG12DP	+1 FS pSGlac7	UGA стоп pSG ^{3/4}	UAA стоп pSG85	UAG стоп pSG12-6
K35	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.0 ± 0.1
L102	0.71 ± 0.01	1.00 ± 0.28	1.0 ± 0.2	0.90 ± 0.03	0.9 ± 0.1	0.93 ± 0.10	1.26 ± 0.10
C1109A U961A	0.69 ± 0.07	0.9 ± 0.3	3.19 ± 0.19	1.03 ± 0.07	1.36 ± 0.03	0.88 ± 0.10	1.52 ± 0.12
C1109G	0.88 ± 0.06	0.83 ± 0.20	1.34 ± 0.02	2.4 ± 0.1	5.0 ± 0.3	2.54 ± 0.10	2.30 ± 0.10
A1191C	0.93 ± 0.08	1.14 ± 0.28	1.38 ± 0.03	4.18 ± 0.05	3.5 ± 0.1	2.97 ± 0.17	2.93 ± 0.07
A1191G	0.75 ± 0.04	1.2 ± 0.2	4.6 ± 0.1	1.26 ± 0.02	0.88 ± 0.09	1.4 ± 0.1	1.29 ± 0.06
A1191U	0.68 ± 0.06	1.0 ± 0.3	1.21 ± 0.02	2.85 ± 0.03	4.92 ± 0.03	2.04 ± 0.10	2.7 ± 0.1
A1201U	0.82 ± 0.01	1.2 ± 0.5	1.35 ± 0.04	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.4	2.39 ± 0.10	3.46 ± 0.07
U961A	1.17 ± 0.01	0.48 ± 0.28	1.40 ± 0.05	2.7 ± 0.2	4.37 ± 0.03	2.84 ± 0.10	2.43 ± 0.10
A1201U U961A	1.06 ± 0.05	0.75 ± 0.28	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	3.9 ± 0.4	2.9 ± 0.1	2.21 ± 0.10

Такое поведение мутантов C1109A/U961A и A1191G в экспериментах *in vivo* коррелирует с результатами предыдущих экспериментов по инициации, транспептидации и транслокации *in vitro*, в которых эти два мутанта вели себя отличным от всех других мутантов образом, проявляя высокий уровень включения неправильной аминокислоты в дипептид и замедленное перемещение комплекса мРНК-тРНК. Из недавно предложенной в литературе обобщенной схемы механизма сдвига рамки считывания в процессе трансляции следует, что и +1, и -1 сдвиг рамки считывания связан с процессами, происходящими с aa-тРНК, связанной с А участком рибосомы. Логично предположить, что мутации C1109A/U961A и A1191G, которые влияют, прежде всего, на структуру декодирующего центра 30S субчастицы и связывание aa-тРНК с А

участком, должны влиять и на сдвиг рамки считывания отличным от других мутаций образом.

4. Локальное изменение структуры декодирующего центра и других участков 16S рРНК

Полученные ранее результаты показали, что мутации влияют, прежде всего, на структурную перестройку 30S субчастицы. Однако остается непонятным, влияют ли мутации только на локальное изменение структуры декодирующего центра или они также вызывают конформационные изменения в других участках 30S субчастицы. Для поиска ответа на этот вопрос был использован метод химического пробинга структуры 16S рРНК.

Для того, чтобы проверить изменение конформации различных участков 30S субчастицы рибосомы, обусловленное введением мутации в спираль 34 16S рРНК, было проведено два типа экспериментов по химическому пробингу 16S рРНК. В одном случае химической модификации подвергали свободные 30S субчастицы, несущие различные мутации в спирали 34, при этом 30S субчастицы дикого типа использовали в качестве контроля. Затем с помощью реакции обратной транскрипции контролировали изменение доступности оснований 16S рРНК для модификации химическими реагентами по всей ее длине. Другой эксперимент был направлен на выяснение того, каким образом мутация A1191G может влиять на диссоциацию рибосом. Известно, что на 30S субчастице существует несколько участков, ответственных за контакт с 50S субчастицей. Согласно данным Ноллера, это пять участков 16S рРНК, в которых происходят изменения при ассоциации субчастиц – районы нуклеотидов 250 (спираль 11), 700 (спираль 23), 790 (спираль 24), 900 (спираль 27) и 1408-1495 (спираль 44). Возможно, что нарушения структуры этих участков контакта субчастиц могут быть вызваны мутацией A1191G. Для того, чтобы определить в каком из этих участков произошло изменение, до модификации химическими реагентами проводили образование инициаторного комплекса.

Эффект мутаций на изменение реакционной способности оснований 16S рРНК в свободных 30S субчастицах был обнаружен только в случае мутаций нуклеотидов A1201 и U961 – A1201U, U961A и A1201U/U961A. Происходило изменение реакционной способности основания A974. A1201 в кристаллической структуре выпетливается из спирали 34 и образует две водородные связи с нуклеотидом U961, который, согласно вторичной структуре, должен образовывать обычную Уотсон-Криковскую пару с A974. Сильнее всего основание A974 подвергается модификации в случае мутанта U961A. Для этого же мутанта наблюдали наиболее сильное нарушение ассоциации рибосомных субчастиц. При обращении U-A пары в мутанте A1201U/U961A происходит восстановление ассоциации субчастиц до уровня рибосом дикого типа (рисунок 3), однако реакционная способность A974 сохраняется, хотя и в меньшей степени. Таким

образом, мутации в триплете A1201-U961-A974 оказывают влияние, прежде всего, на локальное изменение структуры в районе декодирующего центра 30S субчастицы, а не всей субчастицы.

Поскольку пробинг свободных 30S субчастиц не выявил структурных изменений ни в одном из пяти участков 16S рРНК, участвующих в образовании контактов с 50S субчастицей, было решено проверить как влияет мутация A1191G на структуру этих участков на первом этапе трансляции – при образовании инициаторного комплекса. Рибосомы, несущие мутацию A1191G, полностью диссоциированы при 7 мМ Mg^{2+} и всего лишь на 50% ассоциируют при 21 мМ Mg^{2+} , однако при образовании инициаторного комплекса при 7 мМ Mg^{2+} ассоциация значительно улучшается. Химический пробинг показал изменение реакционной способности нуклеотидов при образовании инициаторного комплекса только в одном из пяти участков контакта 30S субчастицы с 50S субчастицей – в спирали 27.

Таким образом, с помощью химического пробинга было обнаружено, что в то время как мутации нуклеотидов A1201 и U961 вызывают только локальное изменение структуры декодирующего центра 30S субчастицы, мутация A1191G вызывает глобальное изменение структуры 30S субчастицы, в частности, структуры одного из участков контакта 30S и 50S субчастиц – спирали 27. Спирали 34 и 27 расположены на достаточном удалении друг от друга в третичной структуре 30S субчастицы и не имеют непосредственных контактов. Это позволяет предположить участие спирали 44, расположенной между ними, в передаче сигнала между спиралями 34 и 27.

5. Метод определения протонированных оснований в РНК и роль протонированных нуклеотидов 23S рРНК

Хотя контакты EF-G с 50S субчастицей изучены значительно лучше, чем с 30S субчастицей, остаются неясными детали взаимодействия EF-G с элементами 50S субчастицы. Так, например, неизвестен молекулярный механизм активации ГТФ-азы EF-G при взаимодействии фактора с рибосомой. Как известно, активация и катализ гидролиза GTP для многих G-белков протекает при участии вспомогательного белка (GAP), который содержит каталитический протонированный остаток аргинина (так называемый “механизм аргининового пальца”). В 50S субчастице в районе взаимодействия с G доменом элонгационных факторов присутствует остаток аргинина Arg74 белка L7/L12, но было показано, что он не принимает участия в катализе. В районе контакта EF-G с 50S субчастицей находится еще ряд рибосомных белков, таких как L10, L11, L6 и L14. В этих белках выявлены несколько консервативных остатков аргинина. Однако было показано, что аминокислотные остатки этих белков не принимают участия в катализе гидролиза GTP на элонгационных факторах EF-G и EF-Tu. Можно предположить, что если для катализа ГТФ-азной активности EF-G и EF-Tu нужна группа, предоставляемая *in trans*, то она должна приходиться из рибосомной РНК.

Ранее в литературе было высказано предположение, что в районе пептидилтрансферазного центра находится остаток аденозина A2451, который может быть протонирован и в таком виде участвует в катализе пептидилтрансферазной реакции. Возможно, в одном из участков связывания элонгационных факторов на 50S субчастице также находится протонированное основание 23S рРНК, которое может принимать участие в катализе гидролиза GTP на EF-G по механизму, сходному с механизмом “аргининового пальца”.

Для выявления протонированных оснований 23S рРНК был разработан новый вариант боргидридного метода химической модификации. Поскольку боргидрид натрия способен восстанавливать N1-метиладенозин, было решено использовать его для модификации протонированных оснований. В восстановленном состоянии основание (аденозин или гуанозин) не способно образовывать Уотсон-Криковскую пару и, следовательно, его можно идентифицировать с помощью реакции обратной транскрипции.

С помощью этого метода в районе связывания элонгационных факторов протонированных оснований не обнаружено. Также не было обнаружено протонированных оснований в 23S рРНК в пептидилтрансферазном центре (A2451). Однако, в 23S рРНК *Escherichia coli* было обнаружено два других протонированных основания - C2575 и A1528. На основании данных о консервативности и расположении пары СН⁺2575-U2511 в третичной структуре 50S субчастицы в непосредственной близости от пептидилтрансферазного центра можно предположить, что эта пара важна для стабилизации пространственной структуры этого функционального центра.

ВЫВОДЫ

1. С помощью нового варианта метода фотоаффинного химического сшивания компонентов аппарата трансляции, разработанного в данной работе, прямо показано, что домен IV EF-G расположен рядом с 30S субчастицей в функционирующей рибосоме;
2. Мутации A1191G и C1109A/U961A замедляют рост клеток и приводят к нарушению ассоциации рибосомных субчастиц;
3. Мутация двух взаимодействующих нуклеотидов 16S рРНК A1201U и U961A нарушают ассоциацию субчастиц, а двойная компенсаторная мутация A1201U/U961A восстанавливает ее до уровня ассоциации рибосомных субчастиц дикого типа;
4. Мутации C1109G, A1191C, A1191U, A1201U, U961A и A1201U/U961A 16S рРНК приводят к повышенной частоте прочтения рибосомой стоп-кодона и +1 сдвига рамки считывания, мутации C1109A/U961A и A1191G – к возрастанию частоты –1 сдвига рамки считывания;
5. Мутация A1191G приводит к изменению структуры спирали 27 16S рРНК, одного из районов контакта 30S и 50S субчастиц;
6. С помощью разработанного в данной работе метода идентификации протонированных оснований РНК в 23S рРНК 50S субчастицы *E.coli*, вблизи ее пептидилтрансферазного центра, обнаружена заряженная пара СН⁺2575-U2511.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кубаренко А.В., Лаврик И.Н., Сергиев П.В., Хойпль М., Роднина М., Винтермаер В., Богданов А.А., Донцова О.А. Метод фотоаффинного химического сшивания как способ выявления контактов фактора элонгации G с малой субчастицей рибосомы. // Доклады Академии Наук - 2003 - т.393 - вып.1 - с.124.
2. Kubarenko A.V., Sergiev P.V., Bogdanov A.A., Brimacombe R., Dontsova O.A. A Protonated Base Pair Participating in rRNA Tertiary Structural Interactions. // Nucl. Acids Res. - 2001 - v.29(24) - p.5067.
3. Baranov P.V., Kubarenko A.V., Gurvich O.L., Shamolina T.A., Brimacombe R. The Database of the *E. coli* ribosomal cross-links:an update. // Nucl. Acids Res. - 1999 - v. 27(1) - p.184.
4. Кубаренко А.В., Лаврик И.Н., Винтермаер В., Донцова О.А., Богданов А.А. Исследование взаимодействия фактора элонгации G с рибосомой с помощью методов химического сшивания. // VII Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам Ломоносов-2000: молодежь и наука на рубеже XXI века. Москва. Апрель 2000 г., с.183.

5. Kubarenko A.V., Lavrik I.N., Wintermeyer W., Dontsova O.A., Bogdanov A.A. Interactions of Elongation Factor G With The Ribosome: A Crosslinking Study. // Trends In Nucleic Acid Chemistry. International Conference. Russia, Moscow, November, 21-24, 2000. p. 67.
6. Kubarenko A.V., Sergiev P.V., Bogdanov A.A., Brimacombe R., Dontsova O.A. Protonated base pair participating in rRNA tertiary structure interactions. // Protein Synthesis. International Conference in Honor of Alexander Spirin. August 27 - September 1, 2001. Institute of Protein Research. Pushchino, Moscow Region, Russia. p. 70.
7. Kubarenko A.V., Sergiev P.V., Bogdanov A.A., Brimacombe R., Dontsova O.A. Protonated base pair participating in rRNA tertiary structure interactions. // The Dynamics of Ribosome Structure and Function, Triennial International Conference on the Ribosome. 27th January – 1st February 2002. Queenstown, New Zealand. Poster, p. 105.