

На правах рукописи



НИКОНОВА ЕКАТЕРИНА ЮРЬЕВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1
С РИБОСОМНОЙ И МАТРИЧНОЙ РНК**

03.00.03. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2006

Работа выполнена в Институте белка РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Гарбер Мария Борисовна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Донцова Ольга Анатольевна

доктор биологических наук

Озолинь Ольга Николаевна

Ведущая организация:

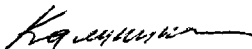
Институт молекулярной биологии
им. В.А.Энгельгардта РАН

Защита состоится “1” июня 2006 года в 10⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 501.001.76. при Московском Государственном
Университете им М. В. Ломоносова по адресу:
119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского.

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

Автореферат разослан “19” апреля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Н.О. Калинина

2006А
8637

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы: Проблема регуляции экспрессии генов - одна из фундаментальных проблем молекулярной биологии. Экспрессия многих генов регулируется на уровне трансляции, что обеспечивает быстрый и чувствительный ответ клетки на изменение внешних условий. Один из хорошо изученных примеров регуляции - это регуляция синтеза рибосомных белков в бактериях. Гены рибосомных белков объединены в опероны и продукт одного из генов может репрессировать свой собственный синтез и экспрессию других генов того же оперона, связываясь с определенным участком полицистронной мРНК. Такой тип регуляции обеспечивает сбалансированный синтез рибосомных белков и рибосомных РНК: если в клетке отсутствуют свободные молекулы рибосомных РНК, белки-репрессоры связываются со специфическими участками на матричных РНК и синтез рибосомных белков прекращается до тех пор, пока не появятся молекулы рРНК. Это классический пример регуляции по принципу обратной связи.

В течение многих лет ведутся работы, посвященные изучению механизмов регуляции трансляции. Накоплен большой объем информации, полученной, главным образом, генетическими и биохимическими методами. Однако структурные основы этого процесса до последнего времени были изучены весьма слабо из-за отсутствия пространственных структур регуляторных РНК-белковых комплексов. Актуальность нашей работы состояла в получении и кристаллизации соответствующих комплексов и в проведении их структурных исследований. Приоритетные работы по определению пространственных структур регуляторных комплексов бактериального и архейного белка L1 в комплексе со специфическими фрагментами мРНК были сделаны в Институте белка РАН в лаборатории структурных исследований аппарата трансляции, где и выполнялась данная диссертационная работа.

Цель работы: выяснение структурных аспектов регуляции экспрессии генов собственного оперона рибосомным белком L1.

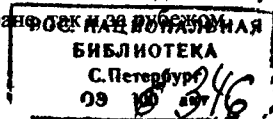
Основные задачи работы:

- получение фрагментов мРНК, специфически связывающих белок L1,
- получение и кристаллизация комплексов рибосомного белка L1 с фрагментами мРНК,
- получение мутантных форм белка L1 с измененным сродством к мРНК и рРНК,
- кристаллизация некоторых мутантных форм белка L1.

Научная новизна и практическая ценность работы. Получены фрагменты мРНК разной длины, специфически связывающие белок L1, и выращены пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы комплексов L1-мРНК. Определение пространственных структур закристаллизованных комплексов позволило идентифицировать структурно-инвариантные участки поверхности белка L1, 23S рРНК и мРНК, ответственные за специфическое связывание.

Методом точечных мутаций в белке L1 найдены ключевые аминокислотные остатки, ответственные за формирование рибосомного и регуляторного комплексов. Показано, что время жизни рибосомного комплекса больше, чем время жизни регуляторного. Повышенная стабильность рибосомного комплекса определяется взаимодействиями домена II белка L1 с двумя петлями рРНК, отсутствующими в мРНК.

Полученные результаты имеют фундаментальный характер. Методические разработки по выделению РНК и белков, по введению точечных замен в участки аминокислотной последовательности белка, а так же по кристаллизации РНК-белковых комплексов могут быть использованы в институтах Российской Академии Наук и других учреждениях биологического профиля как в нашей стране, так и за рубежом.



Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работу иллюстрируют 6 рисунков и 3 таблиц. Общий объем диссертации 168 страниц. Библиография включает 94 названия.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи. Результаты диссертации докладывались на международных и Российских конференциях.

Обзор литературы посвящен оперон-специфической регуляции синтеза рибосомных белков. В нем обсуждаются различные механизмы регуляции трансляции у прокариот.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение и кристаллизация РНК-белковых комплексов для структурных исследований.

Рибосомный белок L1 выполняет в клетке две основные функции: он может специфически связываться как с 23S рРНК, формируя так называемый L1 протуберанец большой субчастицы рибосомы, так и с участком своей мРНК, регулируя собственный синтез. Сродство белка L1 к рРНК примерно на порядок выше, чем к мРНК, что позволяет использовать конкуренцию между 23S рРНК и мРНК за связывание с белком L1 для предотвращения избыточной продукции белков его оперона в клетке. Конкурентный механизм регуляции синтеза предполагает структурное подобие участков 23S рРНК и мРНК, ответственных за специфическое связывание белка L1. Ранее были определены кристаллические структуры свободного белка L1 из трех различных организмов и структура комплекса этого белка со специфическим фрагментом 23S рРНК. Анализ этих структур позволил выделить на поверхностях белка и рРНК участки, предположительно ответственные за РНК-белковое узнавание. Поскольку конкурентный механизм регуляции синтеза основан на незначительном различии в сродстве белка L1 к рРНК и мРНК, получение комплексов этого белка с фрагментами мРНК, их кристаллизация и последующее определение структур имеют решающее значение для выяснения структурных основ регуляции.

Кристаллизация макромолекул – достаточно сложный процесс. Очень многие факторы влияют на способность РНК-белковых комплексов кристаллизоваться. Важны чистота препарата, конформационная гомогенность, структура поверхности молекул, доступность участков для межмолекулярного контакта, а так же стабильность комплекса. Известно, что качество кристаллов РНК-белковых комплексов в значительной степени зависит от длины и структуры используемого фрагмента РНК. Изначально необходимо определить участок РНК, который при минимальной длине сохраняет полное сродство к белку, а в дальнейшем на его основе сконструировать фрагменты РНК, подходящие для кристаллизации комплексов.

1.1 Получение фрагментов мРНК.

Для получения кристаллов комплекса L1-мРНК, пригодных для рентгеноструктурного анализа, был сконструирован ряд специфических фрагментов мРНК (рис.1). В качестве стартового фрагмента мРНК для введения в него различных изменений был выбран фрагмент, изображенный на рис. 1А. Этот фрагмент содержит часть регуляторного L1-связывающего сайта на мРНК_{L1} из *Methanococcus vannielii* и включает область, строго консервативную в 23S рРНК и мРНК, и две спирали, которые участвуют в образовании контакта в рибосомном РНК-белковом комплексе. Верхняя полноразмерная

спирально-петельная часть, не содержащая консервативных нуклеотидов не влияющая на сродство к белку L1, была заменена четырехнуклеотидной петлей UUCG.

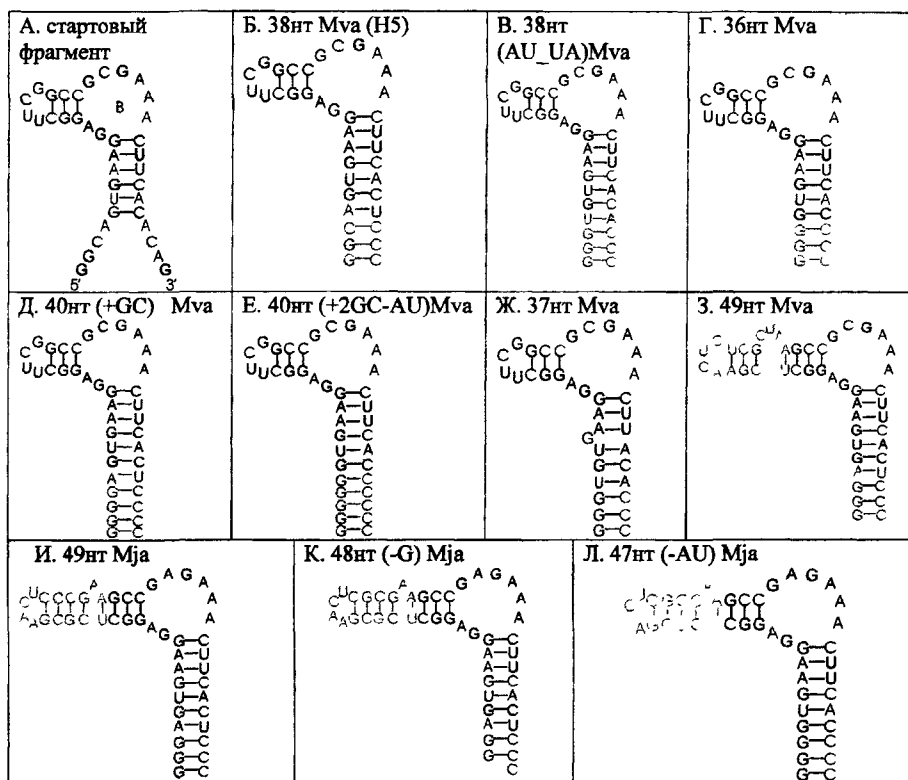


Рисунок 1: Вторичные структуры фрагментов мРНК из *M. vannielii* (Mva) и *M. jannaschii* (Mja), использованные в экспериментах по кристаллизации комплексов L1-мРНК. Фрагменты: А) стартовый фрагмент мРНК; Б) фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 38 нуклеотидов; В) фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 38 нуклеотидов с инвертированной парой (замена AU на UA); Г) фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 36 нуклеотидов (AU пара убрана); Д) фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 40 нуклеотидов с дополнительной GC парой; Е) фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 40 нуклеотидов с 2 дополнительными GC парами, AU пара убрана; Ж) фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 37 нуклеотидов с выступающим нуклеотидом; З) фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 49 нуклеотидов, содержащий полный боковой спирально-петельный участок; И) мРНК из *M. jannaschii* длиной 49 нуклеотидов, содержащая полный боковой спирально-петельный участок; К) мРНК из *M. jannaschii* длиной 48 нуклеотидов, содержащая неспаренный нуклеотид на 3' конце; Л) мРНК из *M. jannaschii* длиной 47 нуклеотидов, содержащая полный боковой спирально-петельный участок (AU пара убрана).

Первым пригодным для кристаллизации фрагментом РНК был 38 нуклеотидный фрагмент (рис. 1Б), у которого неспаренные нуклеотиды были заменены участком

спирали. В дальнейшем, этот фрагмент также был подвергнут модификациям. Так А-У пара, следующая за триплетом G-C пар, была заменена U-A парой (рис. 1В, Ж), что предположительно могло привести к формированию дополнительных кристаллических контактов. На рисунке 1Г показан фрагмент РНК, где эта пара вообще отсутствует. Кроме того, к открытому концу спирали были добавлены дополнительные G-C пары (рис. 1 Д, Е)

Кроме изменений в нижней спирали фрагмента мы заменяли малую боковую петлю из четырех нуклеотидов полноразмерной спирально-петельной частью, присутствующей в исходной мРНК (рис. 1З-Л). Такие более длинные фрагменты мРНК были сконструированы как на основе мРНК из *M. vanielii* (рис. 1З), так и из *M. jannaschii* (рис. 1И-Л). Для оптимизации кристаллической упаковки были сконструированы фрагменты мРНК с измененной длиной нижней спирали (рис. 1К, Л).

Гены специфических фрагментов мРНК были клонированы в вектор pUC18. Все фрагменты РНК, использованные для образования комплексов и для последующей кристаллизации, были получены транскрипцией *in vitro* с использованием Т7 РНК полимеразы с линейаризованных плазмид pUC18, содержащих гены специфических фрагментов мРНК. Эффективность синтеза РНК Т7 РНК полимеразой сильно зависит от концентраций $MgCl_2$, рибонуклеотидов и их соотношения. Концентрации данных компонентов транскрипционной смеси подбирались экспериментально. Концентрации остальных компонентов транскрипционной смеси были постоянны вне зависимости от длины получаемого фрагмента РНК: 80мМ Hepes, pH 7.5; 5мМ ДТТ, 2мМ спермидин. 50-100мкг плазмидной ДНК и 1250 единиц Т7 РНК полимеразы/мл транскрипционной смеси.

Фрагмент РНК очищали от побочных продуктов реакции, а также от компонентов транскрипционной смеси методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях или с помощью гель-фильтрации. В среднем чистота фрагмента РНК была выше 95% (рис. 2).

1 2

- - -



Рис 2: Электрофореграмма фрагментов мРНК, дорожка 1 - транскрипционная смесь; дорожка 2 - очищенный фрагмент мРНК.

Сродство фрагментов мРНК к рибосомному белку L1 определяли с помощью экспериментов по связыванию на нитроцеллюлозных фильтрах. Все использованные нами для кристаллизации фрагменты мРНК связывались с MjaL1 так же хорошо, как и 250 нт фрагменты мРНК_{MjaL1}. При использовании в экспериментах по связыванию стартового фрагмента (рис. 1 А) процент насыщения был очень низким (20-25% от общего количества РНК), поэтому этот фрагмент не был использован для кристаллизации

1.2 Выделение и очистка рибосомных белков L1

Для кристаллизации комплексов использовались белки L1 из термофильных организмов *M. jannaschii* (MjaL1) и *Thermus thermophilus* (TthL1). Для каждого из этих белков был выделен дикий тип и белок с заменами метионинов на селенометионины (для

определения фаз при решении структуры методом мультиволновой аномальной дисперсии).

Гены белков L1 из *M. jannaschii* и *T. thermophilus* экспрессировались в системе Штудииера. В качестве штамма-хозяина использовались клетки *Escherichia coli* BL21(DE3). Для экспрессии архейных белков эти клетки содержали плазмиду pUBS520. Экспрессионные векторы pMjaL1.4 и pACA-L1 несли гены белков MjaL1 и TthL1, соответственно. Клетки штаммов-суперпродуцентов белка L1 растили при 37°C при интенсивном перемешивании (160 об/мин) на богатой среде LB, содержащей 0.2% глюкозы, 100 мкг ампицилина и 50 мкг канамицина на 1 мл среды (для архейных белков) до оптической плотности OD₅₉₀=0.5 ОЕ. Для активации T7 РНК-полимеразы в среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,3 мМ. После добавления индуктора клетки продолжали инкубировать в тех же условиях в течение 3 часов. Схема выделения белка L1 из штаммов-суперпродуцентов включает несколько основных стадий: разрушение клеток, удаление дебриса, осаждение рибосом из клеточного лизата, прогрев, удаление термоллабильных белков и хроматографическое разделение белков. Иногда после хроматографии на смоле CM-Sepharose препарат белка, очищенный от примесных белков *E. coli*, содержал примесь нуклеиновых кислот, от которых мы освобождались с помощью хроматографии на смоле Heparin-Sepharose. Использование такой методики (полу-аффинная хроматография) позволяет получить препарат белка с чистотой до 98% (рис. 3).

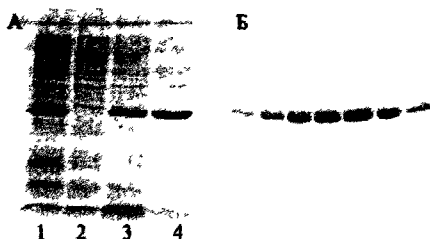


Рис. 3: Электрофореграмма, показывающая стадии очистки белка. А. Стадии очистки до хроматографии: 1 - разрушенная биомасса; 2 - дебрис; 3 - после удаления дебриса; 4 - после прогрева. Б. Фракции, содержащие белок L1, после хроматографии на смоле CM-Sepharose

Для решения проблемы фаз при определении пространственной структуры комплекса могли потребоваться кристаллы, содержащие тяжелые атомы. Один из методов введения их в кристаллы – замена метиониновых остатков на селенометиониновые в аминокислотной последовательности белка. В данной работе были выделены белки, в которых метионины были заменены селенометионинами с целью использования аномального рассеивания на нескольких длинах волн (MAD) для определения фаз. Для выделения таких модифицированных белков использовали штамм-суперпродуцент *E. coli* B834(DE3) ауксотрофный по метионину. Биомасса была выращена на минимальной среде, содержащей селенометионин. Во все растворы добавляли 2 мМ DTT для предотвращения окисления селенометионина.

1.3 Кристаллизация комплексов белка L1 со специфическими фрагментами мРНК

Оптимальная концентрация мРНК для кристаллизации была 5-7 мг/мл. Ренатурацию мРНК проводили при 60°C в течение 10 минут в 1мМ Na-цитратном буфере с последующим охлаждением до 0°C. Фрагмент мРНК и белок смешивались в эквимоллярных количествах. Концентрация MgCl₂ в комплексе в среднем составляла 1.5 мМ. Образование комплексов оценивали методом гель-электрофореза нуклеиновых кислот в ПААГ в неденатурирующих условиях (рис. 4).

Для кристаллизации были использованы не только гомологичные, но и гибридные комплексы, содержащие мРНК и белок L1 из разных организмов. Использование гибридных комплексов возможно, поскольку белки L1 из различных организмов структурно и функционально взаимно заменяемы. Более того, гибридные комплексы иногда обладают большей способностью кристаллизоваться, чем гомологичные. Так кристаллы комплекса белка S8 из *M. jannaschii* с фрагментом рРНК из *T. thermophilus*, а так же комплекса белка L1 из *Sulfolobus acidocaldarius* (SacL1) с фрагментом рРНК из *T. thermophilus* отражали рентгеновские лучи лучше, чем кристаллы гомологичных комплексов из *T. thermophilus*.



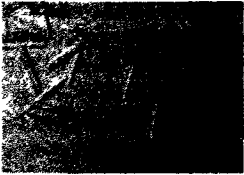
Рис. 4 Электрофоретический анализ комплексов L1-РНК в неденатурирующих условиях. Дорожка 1 – фрагмент мРНК из *M.vannielii* длиной 36 нуклеотидов; дорожка 2 – комплекс MjaL1 с фрагментом мРНК из *M.vannielii* длиной 36 нуклеотидов; дорожка 3 - комплекс TthL1 с фрагментом мРНК из *M.vannielii* длиной 36 нуклеотидов

Первичный поиск условий кристаллизации вели с помощью набора Natrix™ (Hampton research Inc., USA). Кристаллизация велась методом диффузии паров в висячей капле. Обычно смешивали 2 мкл комплекса L1-мРНК с 2 мкл реагента и уравнивали против резервуара, содержащего тот же самый реагент из набора Natrix™. Все кристаллы появлялись в таких условиях, когда осаждающий агент состоял из полиэтиленгликоля (ПЭГ) и моновалентных ионов. После получения первых мелких кристаллов мы оптимизировали условия, меняя концентрации каждого компонента в капле, немного изменяли pH и температуру, а так же вносили различные добавки (соли тяжелых металлов, глицерин, МПД и т.д.). Условия кристаллизации комплексов представлены в таблице 1. Кристаллы, образованные комплексами архейного белка MjaL1 с 49 нт фрагментом мРНК из того же организма и бактериального белка TthL1 с 38 и 36 нт фрагментами мРНК из археи *M. vannielii* оказались пригодными для рентгеноструктурных исследований.

Условия роста кристаллов во всех случаях были близкими. Мы использовали в качестве осадителя ПЭГ 8 или 10т, а буфером был какодилат Na, pH 5.5-7.0. Глицерин, соли ртути и 2-метил-2,4-пентандиол (МПД) улучшали качество кристаллов. Оптимальной для роста кристаллов комплекса TthL1-мРНК была температура 4°C, а кристаллы комплекса MjaL1-мРНК росли как при 4°C, так и при комнатной температуре.

Табл. 1: Результаты экспериментов по кристаллизации комплексов белка L1 с различными фрагментами мРНК

состав комплекса	условия кристаллизации	фотография кристаллов	предел разрешения
TthL1 мРНК _{Mva} 38нт	В капле: 0.375% ПЭГ 10т в 50 мМ какодilate Na, pH=6.0; 0.125 мМ HgCl ₂ , (или 0.063 мМ мерсалила Na); 0.63% глицерина. Противораствор: 20%ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na, pH=6.0. Температура 4°C.		2.8Å
TthL1 мРНК _{Mva} 38нт (AU-UA)	В капле: 1.67% ПЭГ 8т в 50 мМ какодilate Na, pH 5.5. Противораствор: 30 % ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na, pH 5.5. Температура 22°C.		2.6 Å
TthL1 мРНК _{Mva} 40нт (+GC)	В капле: 1% ПЭГ 10т в 50 мМ какодilate Na, pH 5.5; 1% глицерина. Противораствор: 20%ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na, pH 5.5. Температура 4°C.		7Å
TthL1 мРНК _{Mva} 37нт MjaL1 мРНК _{Mva} 37нт	В капле: 2 % ПЭГ 8т в 50 мМ какодilate Na, pH 7.0. Противораствор для комплекса с TthL1: 30 % ПЭГ 8т в 100 мМ какодilate Na, pH 7.0. для комплекса с MjaL1: 5 % ПЭГ 8т в 100 мМ какодilate Na, pH 7.0. Температура 4°C.		5 Å
TthL1 (Lys127Met) мРНК _{Mva} 36нт	В капле: 0.375% ПЭГ 10т в 50 мМ какодilate Na, pH=6.0; 0.125 мМ HgCl ₂ , (или 0.063 мМ мерсалила Na); 0.63% глицерина. Противораствор: 20%ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na, pH=6.0. Температура 4°C.		2.1 Å

MjaI 1 мРНК _{Мja} 49нт MjaL1 мРНК _{Мva} 49нт	В капле: 0.33% ПЭГ 10т в 50 мМ какодilate Na, pH 6.0; 0.66% МПД Противораствор: 30 % ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na, pH 6.0. Температура 22°C.		3.4 Å 5 Å
MjaL1 мРНК _{Мja} 48нт	В капле: 0.5% ПЭГ 10т в 50 мМ какодilate Na, pH 6.0; 0.63% МПД Противораствор: 10 % ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na, pH 6.0. Температура 4°C.		3.5 Å
MjaL1 мРНК _{Мja} 47нт	В капле: 1.25 % ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na. Противораствор: 20 % ПЭГ 10т в 100 мМ какодilate Na, pH 6.0. Температура 4°C.		4 Å

1.4. Комплекс MjaL-mРНК

Кристаллы комплексов белка MjaL1 с короткими фрагментами мРНК отражали рентгеновские лучи до 5-10 Å и часто были разупорядочены. Наилучшие результаты были получены для комплексов белка MjaL1 с наиболее крупными фрагментами мРНК (содержащими полный боковой спирально-петельный участок): кристаллы гомологичного комплекса MjaL1-мРНК (49 нт) отражали рентгеновские лучи до 3.4 Å. Дифракционные данные были собраны на синхротроне Desy в Гамбурге (Германия) с кристаллов, содержащих белок L1 с заменой метионина на селенометионин. Структура комплекса была определена методом мультиволновой аномальной дисперсии.

Модель гомологичного комплекса белка L1 со специфическим фрагментом мРНК длиной 49 нт из *Mjannaschii* представлена на рис. 5. Структура белка MjaL1 в комплексе с мРНК близка структуре белка в свободном состоянии. В обоих случаях белок находится в «открытой» конформации, и при образовании комплекса структура каждого домена не подвергается значительным конформационным изменениям. Белок взаимодействует с мРНК в основном за счет домена I.



Рис. 5: Комплекс MjaL1 с фрагментом мРНК длиной 49 нт. Белок L1 имеет открытую конформацию. Основной контакт с мРНК образован первым доменом.

Фрагмент мРНК представляет собой две регулярные двойные спирали, образующие друг с другом приблизительно прямой угол (рис. 5, 6). Рибозо-фосфатные группы нуклеотидов G37 и C63 сближены, а фосфатные группы нуклеотидов G34, C38 и U65, C66 располагаются примерно в одной плоскости и окружают немного вогнутый участок, за счет которого мРНК в основном и взаимодействует с белком L1. Поверхность нижней спирали фрагмента мРНК комплементарна поверхности β -листа домена I белка L1.

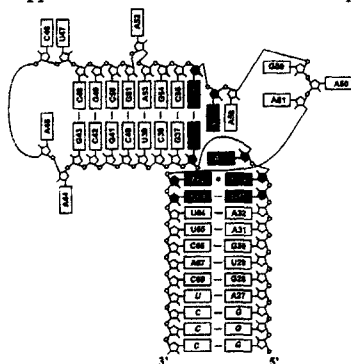


Рис. 6: Схематическое изображение двухмерной структуры 49 нт. фрагмента мРНК из *M. jannaschii*. Черным показаны консервативные нуклеотиды.

Сравнение структур рибосомного и регуляторного комплексов белка L1 показало, что белок образует сеть недоступных растворителю водородных связей со структурно инвариантным мотивом обеих РНК, содержащим строго консервативные нуклеотиды. В то же время число неконсервативных водородных связей в рибосомном комплексе больше, чем в регуляторном, что может быть причиной различного сродства белка L1 к рРНК и мРНК. Однако низкое разрешение полученной структуры комплекса не позволило нам провести детальный анализ РНК-белковых взаимодействий.

1.5. Комплекс TthL1/мРНК

Кристаллы комплексов белка TthL1 с фрагментами мРНК из *M. vannielii*, представленными на рис.1В и Г, отражали рентгеновские лучи до 2.6 и 2.1 Å, соответственно. Комплексы кристаллизовались в пространственных группах P2₁ и P6₅22. Первоначально кристаллы комплексов имели значительную мозаичность (более 1°). Этот недостаток был преодолен добавлением в каплю солей руты. Хотя мы не видели сигнала

от ртути при съемке и не обнаружили ее в структурах комплексов, она положительно влияла на рост кристаллов и снижала их мозаичность.

Наборы дифракционных данных с кристаллов комплексов были собраны на синхротроне Desy в Гамбурге (Германия). Структура комплекса белка TthL1 с 38 нт фрагментом мРНК была определена методом молекулярного замещения и уточнена до разрешения 2.6 Å (рис. 7). В комплексе TthL1 находится в «открытой» конформации, подобно архейным белкам L1, тогда как в изолированном состоянии его домены сближены и контактируют друг с другом, образуя «закрытую» конформацию.



Рис. 7: Изображение комплекса TthL1 с фрагментом мРНК из *M. vannielii* длиной 38нт.

Фрагмент мРНК в этом комплексе, подобно фрагменту мРНК из *M. jannaschii*, содержит две спирали, образующие практически прямой угол. Строго консервативные нуклеотиды, принадлежащие соприкасающимся концам спиралей и межспиральной петле, образуют уникальную структуру, узнаваемую первым доменом белка L1.

Второй домен белка TthL1 во взаимодействиях с мРНК практически не участвует. В асимметричной части элементарной ячейки кристалла содержатся четыре копии комплекса и только в двух из них наблюдается единственная экспонированная в растворитель водородная связь между вторым доменом белка L1 и мРНК.

1.6. РНК-белковое узнавание

Известно, что многие рибосомные белки структурно и функционально взаимозаменяемы в рибосомах из различных организмов. Исходя из этого, можно сделать вывод, что места связывания на РНК и на белке должны включать в себя структурно инвариантные участки, ответственные за РНК-белковое узнавание (так называемые узнающие модули). Ранее в нашей лаборатории было сделано предположение, что узнающий модуль должен содержать полярные и заряженные атомы, формирующие сеть внутримолекулярных РНК-белковых водородных связей, недоступных растворителю.

Детальный анализ пространственных структур белков L1 из различных организмов в свободном и в связанном с РНК состояниях выявил на поверхности белка два участка, структура которых инвариантна во всех известных молекулах L1. Один из этих участков принадлежит домену I и содержит остатки консервативного кластера этого домена, другой включает в себя остатки консервативного кластера домена II (рис. 8).

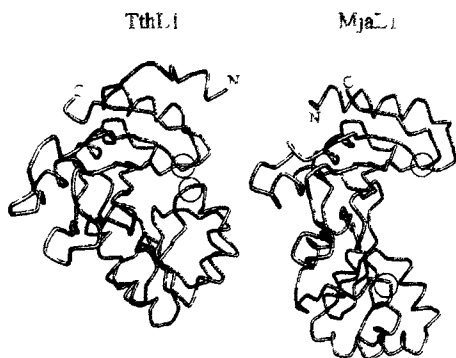


Рис 8. Схематическое изображение пространственных структур рибосомного белка L1 в свободном состоянии. TthL1 имеет закрытую конформацию, два домена белка сближены и контактируют друг с другом. MjaL1 имеет полностью открытую конформацию, домены не контактируют друг с другом. Положение кластеров консервативных остатков, расположенных в домене I и домене II, показано кружками

Первоначально, на основании анализа имеющихся структур свободных белков L1 и рибосомного комплекса SacL1-рРНК мы предполагали, что оба эти участка необходимы белку L1 для узнавания своей мишени на РНК. Однако структура регуляторного комплекса TthL1-мРНК показала, что белок L1 контактирует с мРНК только доменом I. Это позволяет сделать вывод, что инвариантная структура на поверхности первого домена (рис. 9а) достаточна для узнавания структурно инвариантного участка РНК.

В рибосомном комплексе второй домен белка SacL1 контактирует со структурой, образованной петлями А и В 23S рРНК. В мРНК петля А отсутствует, а петля В значительно короче, что приводит к отсутствию контактной области для домена II в мРНК и к уменьшению времени жизни регуляторного комплекса по сравнению с рибосомным. Эти структурные различия, по-видимому, и обеспечивают разницу в родстве белка L1 к рРНК и мРНК, необходимую для конкурентного механизма регуляции синтеза.

Как в рибосомном, так и в регуляторных комплексах фрагменты РНК имеют практически идентичную структуру в месте пересечения спиралей и вокруг него. Этот участок содержит кластер нуклеотидов, строго консервативных в 23S рРНК и мРНК из разных организмов. Нуклеотиды кластера и их ближайшие соседи по последовательности (не более двух с 3' конца) формируют уникальный структурно инвариантный участок (стабилизированный внутримолекулярными водородными связями), который, по-видимому, и узнается белком L1 (рис. 9в).

Для проверки выдвинутых предположений, уточнения границы узнающего модуля и выяснения роли отдельных аминокислотных остатков в специфическом связывании с РНК мы сделали ряд замен в последовательностях белков MjaL1 и TthL1. Полученные мутантные формы были проверены на связывание с рРНК и мРНК и закристаллизованы.

2. Получение мутантных форм белка L1 с измененными РНК-связывающими свойствами.

В качестве основной модельной системы для изучения влияния отдельных аминокислотных остатков на РНК-связывающие свойства белка L1 был выбран MjaL1. Этот выбор был сделан по нескольким причинам: во-первых, MjaL1 один из гипертермофильных белков, работа с которыми сильно упрощена; во-вторых, известны трехмерные структуры этого белка в свободном состоянии и его комплекса с фрагментом мРНК. Для анализа влияния отдельных мутаций на РНК-связывающие способности бактериальных белков был выбран TthL1. Причины его выбора были те же, что и для

MjaL1. Аминокислотные остатки, роль которых в РНК-белковом узнавании мы хотели проверить, выбирались на основе анализа имеющихся структур свободных белков, их комплексов с фрагментами рРНК и мРНК, а также сравнения аминокислотных последовательностей белков L1 из различных организмов.

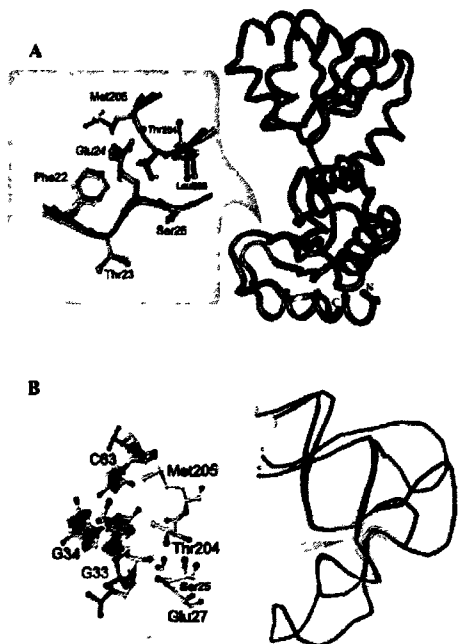


Рис. 9: Структурно инвариантные участки в белке L1 и во фрагментах мРНК и рРНК. А: белок MjaL1, расположение инвариантного участка показано светло-серым цветом. На левой части рисунка показано наложение соответствующих участков белка L1 в изолированном и в связанном с РНК состоянии. В: Наложение фрагментов рРНК. Уникальная консервативная структура выделена светло-серым цветом.

2.1. Выделение мутантных форм белков L1 и тестирование их термостабильности.

Гены мутантных форм белка L1 были получены методом сайт-направленного мутагенеза. Процедура выделения мутантных форм белков MjaL1 и TthL1 не отличалась от процедуры выделения белков дикого типа. Единственным дополнительным шагом было тестирование термостабильности всех мутантных форм белка L1. Оптимальная температура прогрева (важного шага в процедуре выделения белка) подбиралась для каждого белка. Для этого 50 мкл безрибосомного экстракта прогревали в течение 20 минут при 45, 55, 65 и 75°C. Денатурированные белки осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение 10 минут. Обе фракции (супернатант и осадок) анализировали на денатурирующем ПААГ в присутствии ДДС-Na (рис. 10). Все полученные мутантные формы белка L1 обладали такой же термостабильностью, как и белок дикого типа.

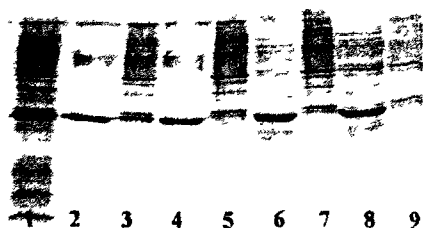


Рис. 10 15% ПААГ с ДДС-Na, окрашенный Кумасси G250 1 – биомасса с экспрессированным геном MjaL1; супернатанты, после удаления денатурированных белков 75°C (2), 65°C (4), 55°C (6), 45°C (8), осажденные денатурированные белки 75°C (3), 65°C (5), 55°C (7), 45°C (9)

2.2 Взаимодействие мутантных форм белка L1 со специфическими фрагментами 23S рРНК и мРНК.

Изучение РНК-связывающих свойств мутантных форм белка L1 осуществляли *in vitro* с помощью связывания на нитроцеллюлозных фильтрах. Плазмиды, содержащие гены специфических фрагментов рРНК и мРНК, были получены ранее в медицинском университете г. Инсбрука (Австрия) для изучения РНК-связывающих способностей архейных белков L1. Длина специфического фрагмента 23S рРНК из *M. jannaschii* составляла 125 нт (нуклеотиды с 2189-2312); длина специфического фрагмента мРНК составляла 104 нт. Ранее было показано, что неспецифическое связывание MjaL1 с любой РНК достаточно велико ($K_d = 5 \times 10^{-5}$ М.). Поэтому для контроля неспецифического связывания мы использовали 145 нуклеотидный фрагмент 16S рРНК, содержащий участок связывания рибосомного белка MjaS8. В ходе данной работы мы сравнивали сродство мутантных форм белка L1 к специфическим фрагментам РНК со сродством белков дикого типа к тем же специфическим фрагментам РНК (положительный контроль). Эти эксперименты проводились в стандартном ТМК-Cl₃₃₀ буфере.

По способности связываться с 23S рРНК и мРНК по сравнению с белком дикого типа все полученные мутантные формы белка L1 можно поделить на три группы:

- 1) белки, связывающиеся с рРНК с такой же аффинностью, как и белок дикого типа, но имеющие пониженное сродство к мРНК;
- 2) белки с пониженным сродством как мРНК, так и к рРНК;
- 3) белки, не связывающиеся с РНК.

На рис. 11 представлены стандартная кривая связывания белка дикого типа с фрагментом 23S рРНК и кривые связывания представителей каждой группы мутантных форм белка MjaL1. Константы диссоциации для комплексов, образованных с 23S рРНК белком L1 дикого типа и его мутантными формами, представлены в таблице 2. В большинстве случаев мы не видим влияния единичных аминокислотных замен на связывание белка с рРНК, однако, в некоторых случаях наблюдается снижение сродства. Отсутствие связывания с рРНК наблюдается только при замене консервативного Thr204 в РНК-узнающем модуле на фенилаланин (Thr204Phe) или же при одновременной замене двух консервативных остатков РНК-узнающего модуля (Glu27Ala и Thr204Ala). В первом случае, по-видимому, происходит значительное искажение рельефа поверхности белка, ответственного за узнавание РНК, во втором случае способность недоступных растворителю полярных атомов РНК образовывать водородные связи с белком оказывается не реализованной, что ведет к дестабилизации комплекса.

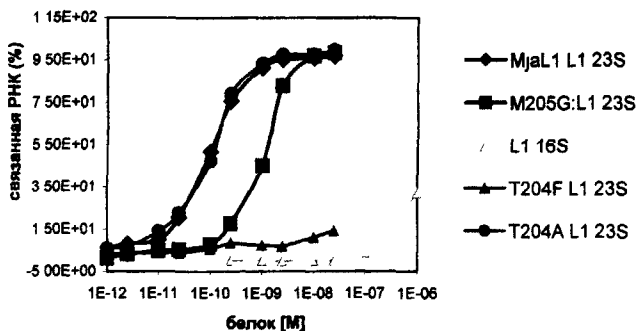


Рис. 11: Кривые связывания мутантных форм белка MjaL1 (M205G, T204F, T204A) и дикого типа MjaL1 (положительный контроль) со специфическим фрагментом 23S рРНК.

На рис.12 представлены стандартная кривая связывания белка дикого типа с фрагментом мРНК и кривые связывания представителей каждой группы мутантных форм белка L1 с тем же фрагментом мРНК. Константы диссоциации для комплексов белка L1 дикого типа и мутантных форм с мРНК представлены в таблице 2.

В большинстве случаев замены консервативных аминокислотных остатков, входящих в предполагаемый узнающий модуль белка MjaL1, приводят к значительному снижению сродства белка к мРНК (вплоть до отсутствия связывания) и не меняют сродство белка к рРНК. Эти эксперименты находятся в хорошем соответствии со структурными данными, поскольку в регуляторном комплексе MjaL1 взаимодействует с мРНК фактически только доменом I. Мутации в области, занятой консервативными аминокислотными остатками этого домена, критичны для регуляторного комплекса и практически не оказывают влияния на рибосомный комплекс.

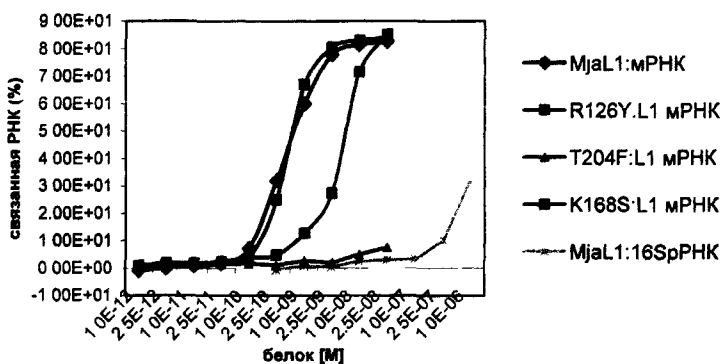


Рис. 12: Кривые связывания мутантных форм белка MjaL1 (R126Y, T204F, K168S) и дикого типа MjaL1 (положительный контроль) со специфическим фрагментом мРНК.

Однако мутации Phe22Arg, Met205Gly и Met205Asp приводят, по-видимому, к значительным, хотя и не катастрофическим, как в случае замены Thr204Phe, изменениям в рельефе поверхности узнающего модуля белка и возможному проникновению растворителя внутрь контактной области, что примерно на порядок ухудшает сродство MjaL1 к рРНК. Двойные замены полярных остатков узнающего модуля MjaL1 на неполярные полностью исключают образование комплексов как с мРНК, так и с рРНК. В этом случае, скорее всего, белок не может опознать свое место на РНК.

белок	Kd мРНК, [M]	Kd рРНК, [M]
MjaL1 (дикий тип)	5×10^{-10}	1.2×10^{-10}
F22A	нет связывания	1.2×10^{-10}
F22H	нет связывания	1.2×10^{-10}
F22R	нет связывания	2×10^{-9}
F22Y	5×10^{-9}	1.2×10^{-10}
S25A	2×10^{-9}	1.2×10^{-10}
S25G	7×10^{-9}	1.2×10^{-10}
S25T	1.5×10^{-9}	1.2×10^{-10}
E27A	нет связывания	1.2×10^{-10}
E27D	5×10^{-10}	1.2×10^{-10}
E27Q	нет связывания	1.2×10^{-10}
R126A	8×10^{-9}	1.2×10^{-10}
R126E	8×10^{-10}	1.2×10^{-10}
R126Y	8×10^{-10}	1.2×10^{-10}
T204A	нет связывания	1.2×10^{-10}
L146A	8×10^{-10}	1.2×10^{-10}
L163Y	9×10^{-9}	1.2×10^{-10}
L16Y/N166K	4×10^{-9}	1.2×10^{-10}
L16Y/N166T	8×10^{-9}	1.2×10^{-10}
T204F	нет связывания	нет связывания
T204G	нет связывания	1.2×10^{-10}
T204S	2.5×10^{-9}	1.2×10^{-10}
M205A	нет связывания	1.2×10^{-10}
M205F	нет связывания	1.2×10^{-10}
M205G	нет связывания	2×10^{-9}
M205D	нет связывания	3×10^{-9}
L146F	2×10^{-9}	1.2×10^{-10}
L163Y	7×10^{-9}	1.2×10^{-10}
L163Y/N166K	5×10^{-9}	1.2×10^{-10}
L163Y/N166T	7×10^{-9}	1.2×10^{-10}
K168S	9×10^{-9}	5×10^{-9}
E27A/T204A	нет связывания	нет связывания
ThhL1 (дикий тип)	8×10^{-8}	2×10^{-9}
R134A	8×10^{-8}	2×10^{-9}
T217A	нет связывания	2×10^{-8}
F37I	2×10^{-5}	1.5×10^{-4}
F37V	нет связывания	4×10^{-4}
S211A	9×10^{-4}	4×10^{-9}
M218L	9×10^{-7}	3×10^{-9}
M218V	1.5×10^{-3}	1.5×10^{-8}
I домен	не детектируется	не детектируется

Табл.2. Кажущиеся константы диссоциации рибосомных белков L1 дикого типа и их мутантных форм с фрагментами 23S рРНК и мРНК.

Отдельно следует остановиться на замене Lys168Ser в области междоменного контакта. Этот остаток не принадлежит к узнающему модулю, но, тем не менее, его замена оказывает влияние на сродство MjaL1 как к мРНК, так и к рРНК. Можно предположить,

что эта замена понижает вероятность существования конформации белка, пригодной для связывания с РНК. Уменьшение доли такой конформации в общем пуле конформаций свободного MjaL1 приводит к увеличению равновесной кажущейся константы диссоциации.

Комплекс бактериального белка TthL1 с фрагментом рРНК оказывается значительно более чувствительным к одиночным мутациям в узнающем модуле, чем комплекс архейного белка. Это можно объяснить тем, что в домене II бактериального белка отсутствует сильно заряженная спираль, которая, взаимодействуя со структурой, образованной петлями А и В 23S рРНК, стабилизирует архейный комплекс.

Как упоминалось ранее, контакт между первым доменом белка L1 и РНК может обеспечить образование стабильного комплекса. Для подтверждения того, что строго консервативные аминокислотные остатки домена II этого белка не важны для специфического связывания с РНК нами были сделаны замены аминокислотных остатков Arg126 и 134 в MjaL1 и TthL1, соответственно, а так же получен изолированный домен I белка L1 из *T. thermophilus*. Для всех этих мутантных форм белка L1 была проверена способность связывать рРНК и мРНК. Замены строго консервативного Arg126/134 во втором домене MjaL1/TthL1 практически не сказываются на РНК-связывающей способности белка. Однако эксперименты по связыванию РНК-белковых комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах и изучение изменения подвижности РНК в ПААГ в неденатурирующих условиях показали, что РНК-связывающая способность полученного нами изолированного домена I белка TthL1 сильно снижена по сравнению с белком дикого типа. Тем не менее, такой белок образует комплексы со специфическими фрагментами как мРНК, так и рРНК.

Таким образом, точечные мутации в узнающем модуле белка L1 подтвердили, что полярные остатки, формирующие этот модуль, играют ключевую роль в образовании комплекса. Из неполярных остатков в узнающий модуль белка, по-видимому, следует включить строго консервативный Phe22 (Phe37 в TthL1), который закрывает область специфического контакта от доступа молекул растворителя. Замены в кластере строго консервативных аминокислотных остатков домена II белка L1 практически не влияют на специфическое связывание белка с РНК, что согласуется с высказанным ранее предположением о возможной роли этого домена в обеспечении конкурентного механизма регуляции синтеза.

Поскольку точечные замены любого аминокислотного остатка могут привести к значительным изменениям в структуре белка L1, для выявления таких изменений необходимо было получить кристаллы и определить пространственные структуры соответствующих мутантных форм. Наибольший интерес представляют формы, потерявшие родство к мРНК или к мРНК и рРНК одновременно.

2.3. Кристаллизация мутантных форм белка L1.

Для кристаллизации были выбраны белки MjaL1, содержащие замены Glu27Ala, Thr204Phe, Thr204Ala, Glu27Ala/Thr204Ala, Met205Asp, и TthL1 с заменами Phe37Ile, Ser211Ala, Thr217Ala.

Кристаллизация велась методом диффузии паров в висячей капле при 6 °C (мутантные формы MjaL1) и 22 °C (мутантные формы TthL1). В случае мутантных форм белка MjaL1 капля содержала 3 мкл раствора белка (18мг/мл) в какодilate Na (pH=7.5), 1.5

мкл преципитирующего раствора и 1 мкл 15% МПД. Преципитирующий раствор содержал 6-10% ПЭГ 10т или 8т, 22% ММЕПЭГ 5т, 0.012% МПД pH 7.0-8.5. Противораствор состоял из 33% ПЭГ 10т, 0.1M Hepes/NaOH, pH 7.5. Кристаллы появлялись через 2-3 дня и росли до максимального размера 0.3 мм x 0.2 мм x 0.1 мм в течение 1 недели (рис.13). Кристаллы были очень нестабильны в различных сохраняющих растворах, поэтому мы их фиксировали в парах 0.25% раствора глutarового альдегида. Такие кристаллы были успешно использованы для сбора дифракционных данных. Перед заморозкой в жидком азоте кристаллы мутантных форм белка MjaL1 переносили в раствор 21 % бутан-2,3-диола, 1.5 % ПЭГ 10т., 50 mM Hepes/NaOH, pH 7.5.



TthL1 с заменой Thr217Ala (1.45 Å)



TthL1 с заменой Phe37Ile (1.3 Å)



MjaL1 с заменой Glu27Ala (2.1 Å)



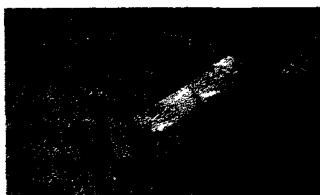
MjaL1 с заменой Thr204Ala (2.0 Å)



MjaL1 с заменой Thr204Phe (2.0 Å)



MjaL1 с заменами
Glu27Ala/Thr204Ala (2.1 Å)



MjaL1 с заменой Met205Asp (2.8 Å)



MjaL1 с заменой Ser211Ala (1.5 Å)

Рис 13: Кристаллы мутантных форм белка L1

Мутантные формы белка TthL1 диализовали против раствора, содержащего 30% сульфата аммония, 100мМ Gly/NaOH (pH 10.0) и 5% МПД. Капли содержали 9 мкл раствора белка (12 мг/мл) и 1мкл 10 мМ HgCl₂. Противораствор состоял из 60% сульфата аммония и 6% МПД. Кристаллы появлялись через 3-4 дня и вырастали до максимального размера 0.4х0.3х0.2мм в течение недели (рис. 13). Перед замораживанием в жидком азоте кристаллы были перенесены в криораствор, содержащий 30% глюкозы и 60% сульфата аммония.

Наборы дифракционных данных с этих кристаллов были собраны на синхротроне Desy в Гамбурге (Германия). Все кристаллы сохранили пространственную группу, к которой принадлежал белок дикого типа, и параметры его элементарной ячейки. Структуры некоторых мутантных форм белка L1 определены и уточнены с высоким разрешением. Анализ решенных структур показал, что, как мы и планировали, в большинстве случаев замены привели к локальным изменениям в структуре поверхности узнающего модуля, не оказав влияния на конформацию белка в целом.

ВЫВОДЫ

1. Получены пригодные к рентгеноструктурному анализу кристаллы комплекса рибосомного белка MjaL1 с фрагментом его мРНК, и двух комплексов рибосомного белка TthL1 с разными по длине фрагментами архейной мРНК, кодирующей белок MvaL1.
2. Определены пространственные структуры комплекса MjaL1-мРНК_{MjaL1} с разрешением 3.4 Å и комплекса TthL1-мРНК_{MvaL1} с разрешением 2.6 Å (совместно с группой структурных исследований рибосомных белков).
3. Получены мутантные формы белков MjaL1 и TthL1 с заменами аминокислотных остатков, вовлеченных в РНК-белковые взаимодействия, и измерены константы связывания этих белков с мРНК и рРНК.
Подтверждено выдвинутое ранее предположение о ключевой роли кластера консервативных аминокислотных остатков первого домена белка L1 в специфическом связывании с РНК.
Подтверждены выводы, сделанные из сравнительного анализа структур комплексов L1-рРНК и L1-мРНК, об определяющей роли домена II белка L1 в обеспечении повышенного сродства этого белка к рРНК по сравнению с его сродством к мРНК.
4. Получены кристаллы ряда мутантных форм белка L1, что позволило определить пространственные структуры пяти из этих мутантных белков.
Показано, что замены полярных остатков на аланин не приводят к значительным изменениям рельефа поверхности белка L1, контактирующей с РНК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Nevskaya N., Tishchenko S., Gabdoulkhakov A., Nikonova E., Nikonov O., Nikulin A., Platonova O., Garber M., Nikonov S., Piendl W. Ribosomal protein L1 recognizes the same specific structural motif in its target sites on the autoregulatory mRNA and 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33(2):478-85.
2. Nevskaya N., Tishchenko S., Volchkov S., Klyashtorny V., Nikonova E., Nikonov O., Nikulin A., Kohrer C., Piendl W., Zimmermann R., Stockley P., Garber M and Nikonov S. New insight into the interaction of ribosomal protein L1 with RNA. *JMB* 2006, 355: 747-59.
3. Nikonova E.Yu., Tishchenko S.V., Piendl W., and Garber M.B. Crystallization of L1-mRNA complexes. Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to the golden jubilee of the double helix of the DNA and 30 anniversary of the Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 2003. Abstracts, p. 185.
4. Никонова Е.Ю., Платонова О.Б., Пиндл В., Невская Н.А., Никонов С.В., Гарбер М.Б. Влияние мутаций в белке L1 из *Methanococcus jannaschii* на его сродство к рибосомным РНК. XVI зимняя молодежная научная школа, Москва, Россия, 2004. Тезисы докладов и стендовых сообщений, стр. 35.
5. Никонова Е.Ю., Платонова О.Б., Тищенко С.В., Пиндл В., Гарбер М.Б. Кристаллизация комплексов рибосомного белка L1 со специфическими фрагментами мРНК. 8-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, Россия, 2004. Сборник тезисов, стр.23.
6. Никонова Е.Ю., Тищенко С.В., Костарева О.С., Никулин А.Д., Пиндл В., Гарбер М.Б. Кристаллизация регуляторных комплексов белка L1 с мРНК. XVII зимняя молодежная научная школа, Москва, Россия, 2005. Тезисы докладов, стр. 12.
7. Волчков С.А., Кляшторный В.Г., Никонов О.С., Тищенко С.В., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Гарбер М.Б. Структура комплекса рибосомного белка L1 из *Thermus thermophilus* со специфическим фрагментом мРНК из *Methanococcus vannielii*. XVII зимняя молодежная научная школа, Москва, Россия, 2005. Тезисы стендовых сообщений, стр. 36.
8. Волчков С.А., Кляшторный В.Г., Тищенко С.В., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Невская Н.А., Никонов С.В. Выделение функционально значимых сайтов на поверхности комплекса L1-мРНК. 9-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, Россия, 2005. Сборник тезисов, стр.13.
9. Никонова Е.Ю., Тищенко С.В., Пиндл В., Гарбер М.Б. Влияние аминокислотных замен в белке L1 на его сродство к фрагментам рРНК и мРНК. 9-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, Россия, 2005. Сборник тезисов, стр.42.
10. E. Nikonova, N. Nevskaya, S. Tishchenko, S.Volchkov, V. Klyashtornii, O. Nikonov, A. Nikulin, O. Platonova, W. Pindl, R. Zimmermann, M.Garber, S. Nikonov. Ribosomal protein L1 recognizes the same specific structural motif in its assembly site on 23S rRNA. Murnau, Germany, 2005. Abstracts, p. 58.
11. Волчков С.А., Кляшторный В.Г., Никонов О.С., Тищенко С.В., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Невская Н.А., Никонов С.В., Гарбер М.Б. Изучение РНК-связывающих свойств рибосомного белка L1. Структурные аспекты регуляции трансляции. XVIII зимняя молодежная научная школа, Москва, Россия, 2006. Тезисы докладов, стр. 6.

Принято к исполнению 13/04/2006
Исполнено 17/04/2006

Заказ № 267
Тираж: 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
(495) 747-64-70
www.autoreferat.ru

2006A
8637

№ - 8637