

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

На правах рукописи

КИПАРISOB Сергей Владиславович

**ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ЭЛЕМЕНТОВ
ЦЕНТРАЛЬНОГО ПРОТУБЕРАНЦА БОЛЬШОЙ СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ**

02.00.10 - биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2005 г.

Работа выполнена на кафедре Химии Природных Соединений Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, на факультете Клеточной Биологии и Молекулярной Генетики Университета штата Мэрилэнд, Колледж Парк, США и в Институте Молекулярной Генетики им. М. Планка, Берлин, Германия.

Научные руководители:

кандидат химических наук, доцент
Сергиев Петр Владимирович;
доктор химических наук, профессор
Донцова Ольга Анатольевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Гарбер Мария Борисовна
доктор химических наук, профессор
Цетлин Виктор Ионович

Ведущая организация:

Институт Молекулярной Биологии
им. В. А. Энгельгардта РАН

Защита состоится 29 ноября 2005 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, МГУ, лабораторный корпус "А", аудитория 501.

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

Автореферат разослан 28 октября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Смирнова И.Г.

2006-4
23071

2220897

1

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

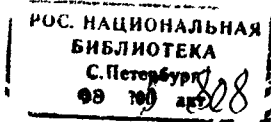
Актуальность проблемы. Какова функциональность тех или иных элементов структуры рибосомы? Каков тонкий механизм координации биосинтеза белка? Является ли структура рибосомы “жесткой” и ее роль – правильно располагать тРНК в пространстве и участвовать в катализе пептидилтрансферазной реакции, а передача сигнала между пространственно разнесенными функциональными центрами осуществляется через молекулы тРНК? Или структура рибосомы “динамична”, и цикл ее работы сопровождается серией аллостерических изменений, передающих конформационный сигнал по цепи связанных структурных элементов между функциональными центрами? Верхняя часть центрального протуберанца большой субъединицы подвижна при транслокации, а голова 30S субъединицы изменяет положение при декодировании. В данной работе была исследована структурная и функциональная роль консервативных элементов центрального протуберанца большой субчастицы рибосомы – 5S рРНК рибосом *Saccharomyces cerevisiae* и спирали 38 23S рРНК рибосом *Escherichia coli*. Положение этих элементов в структуре рибосомы предполагает их непосредственное участие в передаче конформационного, аллостерического сигнала во время биосинтеза белка.

Цель работы.

1. Изучить особенности функционирования рибосом *Escherichia coli*, содержащих укороченную спираль 38 23S рРНК, *in vitro*.
2. Определить изменения структуры 70S рибосом *E. coli*, вызванные укорочением спирали 38 23S рРНК.
3. Охарактеризовать фенотип клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, продуцирующих рибосомы, 5S рРНК которых содержит точечные мутации.
4. Определить изменения структуры 80S рибосом *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих точечные мутации в 5S рРНК.

Научная новизна и практическая значимость.

Была проверена способность мутантных 50S субчастиц рибосом *Escherichia coli*, содержащих укороченную спираль 38 23S рРНК, в которой был удален участок 872-905 полинуклеотидной цепи, к ассоциации с 30S субчастицами. Кроме этого, для таких рибосом была определена эффективность *polyU* зависимого синтеза *polyPhe* и измерена стимуляция ГТФазной активности EF-G рибосомами и их комплексами с *polyU* и деацилированной тРНК^{Phe}. Укорочение спирали 38 23S рРНК замедляет рост клеток и влияет на ассоциацию субчастиц, при этом оно не летально для клеток, не вызывает изменений в принципиальных стадиях элонгационного цикла, а также не влияет на способность деацилированной тРНК,



связанной в Р-участке, стимулировать ГТРазную активность EF-G. С помощью химического пробинга выявлены структурные элементы 23S рРНК, конформации которых взаимосвязаны, и показано, что локальные изменения могут передаваться по цепям из элементов рибосомы на большие расстояния.

Среди 246 точечных мутаций в 5S рРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* только 7 оказались нелетальными для клеток. Химический пробинг показал незначительные изменения конформаций оснований нуклеотидов D-петли 5S рРНК и спирали 95 25S рРНК. Такие результаты подтверждают, что 5S рРНК высокоструктурированная и консервативная молекула. Для рибосом *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих точечные мутации в 5S рРНК, была измерена эффективность запрограммированного сдвига рамки считывания трансляции, полученные результаты были объяснены с точки зрения обобщенной модели запрограммированного сдвига рамки считывания.

Таким образом, в работе был применен комплексный подход, основанный на методах функционального исследования рибосом *in vivo* и *in vitro*, а также на методах химического пробинга структуры РНК. Этот подход может быть успешно использован для исследования широкого круга рибонуклепротеидных комплексов, и его разработка является важным этапом в развитии методов изучения динамики работы рибосомы при биосинтезе белка.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на следующих конференциях: Международном симпозиуме Держателей грантов Медицинского института Говарда Хьюза, Таллин, Эстония, 2004 г.; Международной конференции студентов и аспирантов "Ломоносов -2005", Москва, Россия, 2005 г.; Конференция Европейской Молекулярно-Биологической Организации "Синтез белка и трансляционный контроль", Гейдельберг, Германия, 2005 г.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 103 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы, выводы. Материал иллюстрирован 50 рисунками и 8 таблицами. Библиографический указатель включает 244 цитированных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследования спирали 38 23S рРНК

Спираль 38 23S рРНК (или А-сайтвый палец) выступает из межсубъединичной поверхности в области центрального протуберанца большой субчастицы рибосомы в сторону малой субчастицы (Рисунок 1А). Спираль 38 23S рРНК взаимодействует с центральным доменом 5S рРНК, контактирует с тРНК, связанной в А-участке, и образует В1а

межсубъединичный мостик, взаимодействуя с белком S13. В нашей лаборатории был получен штамм *E. coli*, продуцирующий только мутантные рибосомы, содержащие укороченную спираль 38 23S рРНК, в которой был удален участок 872-905 полинуклеотидной цепи (Рисунок 1В). Укорочение спирали вызывает разрушение межсубъединичного мостика B1a, поэтому такая мутация была названа $\Delta B1a$.

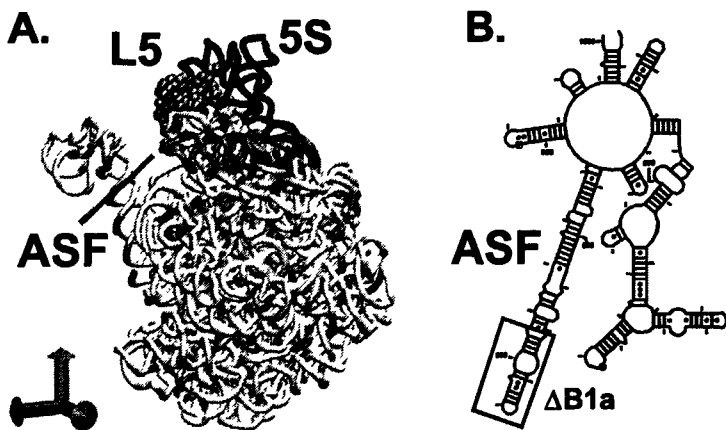


Рисунок 1. Мутация $\Delta B1a$. А. Структура большой субъединицы *Thermus thermophilus*, показана спираль 38 23S рРНК (ASF), 5S рРНК (5S) и белок L5. В. Схематичное представление части 5'-концевого домена 23S рРНК *E.coli*. Прямоугольником выделен участок 872-905 полинуклеотидной цепи 23S рРНК, удаление которого приводит к мутации $\Delta B1a$.

Ранее было показано, что мутация $\Delta B1a$ нелетальна для клеток, хотя и приводит к замедлению роста клеток и к незначительному увеличению частоты сдвига рамки считывания и прочтения стоп кодонов.

1.1. Влияние мутации $\Delta B1a$ на ассоциацию рибосомных субчастиц

Установлено, что спираль 38 23S рРНК принимает участие в ассоциации рибосомных субъединиц. Эксперименты по пробингу гидроксил-радикалами показали защиту нуклеотидов 884-902 23S рРНК при ассоциации большой и малой субъединиц рибосом *E. coli*. Так как укорочение А-сайтового пальца приводит к разрушению B1a межсубъединичного мостика, была проверена способность мутантных $\Delta B1a$ 50S субчастиц к ассоциации с 30S субчастицами при различных концентрациях ионов Mg^{2+} , результаты эксперимента приведены на рисунке 2.

Рибосомы дикого типа были ассоциированы на 30% при низкой концентрации, и практически полностью ассоциированы при высокой концентрации ионов Mg^{2+} , и, напротив, рибосомы $\Delta B1a$ были сильно диссоциированы при низких, ассоциированы наполовину при

средних и сохраняли способность к диссоциации при высоких концентрациях ионов Mg^{2+} . Таким образом, укорочение А-сайтового пальца приводит к снижению способности субчастиц к ассоциации, что может объяснять понижение скорости роста клеток, вырабатывающих мутантные рибосомы.

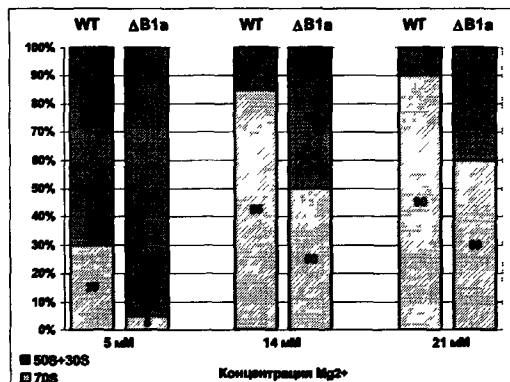


Рисунок 2. Эффект удаления участка 872-905 спирали 38 23S рРНК *E. coli* на ассоциацию субчастиц при различных концентрациях ионов Mg^{2+} . WT – рибосомы дикого типа, $\Delta B1a$ – рибосомы, содержащие укороченную спираль 38 23S рРНК. Светло-серым показана доля (%) 70S субчастиц, темно-серым – доля (%) 50S и 30S субчастиц.

1.2. Эффективность polyU зависимого синтеза polyPhe для рибосом, содержащих мутацию $\Delta B1a$

Мутантные рибосомы и рибосомы дикого типа были протестированы на способность polyU зависимого синтеза polyPhe. Мутантные рибосомы синтезировали такое же количество полифенилаланина (21 ± 2 пмоль Phe/пмоль рибосом), как и рибосомы дикого типа. Уровень ошибочного включения лейцина для рибосом дикого типа составлял $2,9 \pm 0,4 \times 10^3$ Phe/Leu, столько же, сколько и для мутантных рибосом – $2,8 \pm 0,4 \times 10^3$ Phe/Leu. Эти результаты свидетельствуют об отсутствии значительного влияния укорочения спирали 38 23S рРНК на элонгацию.

1.3. Эффективность отдельных стадий элонгационного цикла для рибосом, содержащих мутацию $\Delta B1a$

Мутантные рибосомы были протестированы на эффективность протекания индивидуальных стадий элонгационного цикла с помощью пошаговой системы трансляции *in vitro*. Для эксперимента была использована синтетическая неприродная мРНК: MFK-мРНК, кодирующая Met-Phe-Lys (MFK) полипептид (Рисунок 3А). Эффективность отдельных стадий элонгационного цикла была детектирована методом тупринтинга

(от англ. toe-printing), который позволяет определять положение рибосомы на мРНК и полноту образования комплекса.

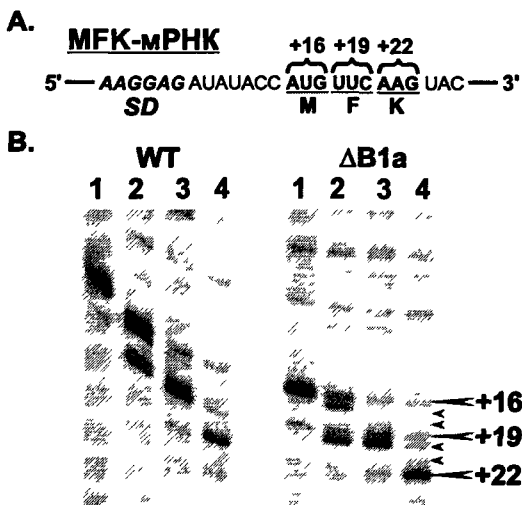


Рисунок 3. Пошаговая трансляция мРНК, кодирующей MFK пептид. **A.** Схематичное изображение первичной структуры MFK-мРНК, показана часть мРНК, содержащая последовательность Шайна-Дальгарно – SD, и транскрибируемые кодоны, которые отмечены фигурными скобками, нумерация соответствует местам остановки обратной транскриптазы. **B.** Радиоавтограф разделения электрофорезом в 10% полиакриламидном геле продуктов обратной транскрипции MFK-мРНК с 5'- радиоактивно меченного праймера. Линии соответствуют различным комплексам: (1) - комплекс рибосом (0,1 μM), MFK-мРНК (0,1 μM) и fMet-тРНК^{fMet} (0,2 μM); (2) - комплекс рибосом (0,1 μM), MFK-мРНК (0,1 μM), fMet-тРНК^{fMet} (0,2 μM) и Phe-тРНК^{Phe}·EF-Tu·GTP (0,2 μM); (3) – то же, что и в (2), но после добавления EF-G·GTP (0,1 μM); (4) то же, что и в (3), но после добавления Lys-тРНК^{Lys}·EF-Tu·GTP (0,2 μM). Обозначены места остановки обратной транскриптазы, отсчет ведется с А инициаторного кодона AUG. WT – рибосомы дикого типа, ΔB1a – рибосомы с укороченным ASF.

Связывание инициаторной fMet-тРНК^{fMet} в Р-участке рибосом было почти количественным как для рибосом дикого типа, так и для рибосом ΔB1a. На геле появлялась единственная полоса в положении +16 от нуклеотида А инициаторного кодона AUG (Рисунок 3В, линия 1), такой сигнал объясняется тем, что MFK-мРНК содержит только один AUG кодон и рибосома хорошо позиционируется на этом кодоне за счет взаимодействия с последовательностью Шайна-Дальгарно и fMet-тРНК^{fMet}.

Ферментативное (зависимое от EF-Tu и GTP) связывание следующей тРНК - Phe-тРНК^{Phe} в А-участке приводило к появлению дополнительного сигнала в положении +17 (Рисунок 3В, линия 2) в обоих образцах рибосом. Это связано с конформационным изменением рибосомы при связывании тРНК в А-участок. Кроме этого, при связывании двух тРНК наблюдается появление зоны, соответствующей положению UUC кодона в Р-сайте рибосомы – положения

+19, +20 (Рисунок 3В, линия 2). Это явление может быть объяснено прохождением спонтанной EF-G-независимой транслокации. Интенсивность полос для рибосом, несущих $\Delta B1a$ мутацию, и для рибосом дикого типа была одинаковая, что свидетельствует об одинаковой эффективности связывания тройного комплекса.

После связывания Phe-tРНК^{Phe} и пептидилтрансферазной реакции при добавлении EF-G*GTP проходила транслокация. Появление характеристических полос в положениях +19 и +20 свидетельствовало об одинаковой степени транслокации для $\Delta B1a$ и рибосом дикого типа (Рисунок 3В, линия 3). При последующем добавлении тройного комплекса Lys-tРНК^{Lys}*EF-Tu*GTP к реакционной смеси происходило связывание лизинового тРНК в А-участке, аккомодация, пептидилтрансферазная реакция и последующая транслокация за счет EF-G, добавленного на предыдущих стадиях реакции. Эффективность второго раунда транслокации для рибосом дикого типа и $\Delta B1a$ была одинаковой и выражалась в остановке обратной транскриптазы на нуклеотиде в положении +22 от нуклеотида А инициаторного кодона AUG (Рисунок 3В, линия 4).

Несмотря на то, что консервативный элемент структуры 23S рРНК спираль 38 находится близко от "локтя" тРНК, связанной в А-участке, и образует межсубъединичный мостик В1а, который может быть вовлечен в конформационные перестройки при транслокации и декодировании, укорочение данного элемента не вызывает изменений в эффективности прохождения отдельных стадий элонгационного цикла в пошаговой системе трансляции *in vitro*. Функциональные тесты не выявили различий между $\Delta B1a$ рибосомами и рибосомами дикого типа при связывании тРНК с А и Р - участками и транслокации.

1.4. Стимуляция ГТРазной активности EF-G функциональными комплексами рибосом, несущих $\Delta B1a$ мутацию

Биохимические эксперименты показали, что присутствие или отсутствие полипептидной цепи на тРНК в Р-участке может контролировать связывание трансляционных факторов IF2, EF-G и RF3. В ходе биосинтеза белка EF-G взаимодействует с рибосомой, несущей деацилированную тРНК в Р-участке и пептидил-тРНК в А-участке, то есть с рибосомой в претранслокационном состоянии. Из результатов экспериментов, проведенных в лаборатории Эренберга, известно, что комплекс рибосомы с деацилированной тРНК в Р-участке достаточно эффективно имитирует претранслокационное состояние и стимулирует ГТРазную активность EF-G.

Была измерена ГТРазная активность EF-G, индуцированная рибосомами дикого типа и $\Delta B1a$ мутантными рибосомами, а также их комплексами с polyU и деацилированной тРНК^{Phe}, которая связывается преимущественно в Р-участке. Зависимость скорости гидролиза GTP от концентрации EF-G представлена на рисунке 4А.

Мутация $\Delta B1a$ значительно не повлияла на способность деацилированной тРНК стимулировать ГТРазную активность EF-G. При этом ГТРазная активность EF-G, вызванная мутантными рибосомами как в присутствии, так и в отсутствие деацилированной тРНК, была снижена по сравнению с рибосомами дикого типа (Рисунок 4).

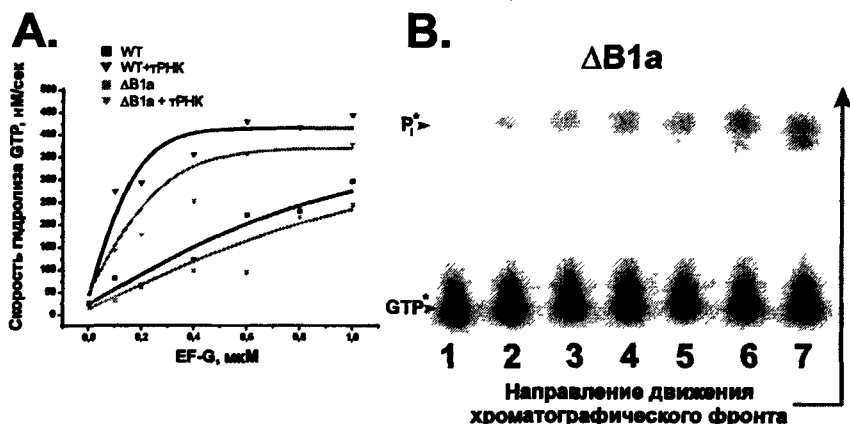


Рисунок 4. Стимуляция ГТРазной активности EF-G рибосомами дикого и $\Delta B1a$ типов. А. Зависимость скорости гидролиза ГТФ от концентрации EF-G. Серые значки соответствуют рибосомам $\Delta B1a$, черные - рибосомам дикого типов. Квадраты соответствуют пустым рибосомам, треугольники - комплексам рибосома*polyU*тРНК^{РНК}. В. Радиоавтограф хроматограммы разделения продуктов гидролиза ГТФ EF-G, индуцированного рибосомами $\Delta B1a$ типа. Цифры от 1 до 7 соответствуют концентрациям EF-G: 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мкМ. P_i^* - радиоактивный неорганический фосфат. ГТФ* - γ -[³²P]-ГТФ.

1.5. Структурные изменения в рибосоме при мутации $\Delta B1a$

Для определения структурных изменений, которые могут возникнуть в рибосоме при укорочении спирали 38 23S рРНК, был использован метод химического пробинга. Мутация не повлияла на реакционную способность оснований 16S рРНК, однако было найдено несколько групп оснований 23S рРНК, реакционная способность которых изменилась в мутантных рибосомах по сравнению с рибосомами дикого типа.

Первая группа нуклеотидов, реакционная способность которых изменялась, была сконцентрирована между местом контакта спирали 38 с 5S рРНК и пептидилтрансферазным центром рибосомы. Так, увеличилась реакционная способность нуклеотидов U2249, G2250 и G2255 спирали 80 23S рРНК (Р-петли), которая является компонентом пептидилтрансферазного центра (Рисунок 5А). Увеличилась реакционная способность G956 спирали 39 23S рРНК, соединяющей Р-петлю со спиралями 81, 89 и 5S рРНК (Рисунок 5В), и U89 D-петли 5S рРНК (Рисунок 5С).

Кроме реакционной способности оснований нуклеотидов, находящихся в регионах, близких к ASF, изменялась реакционная способность оснований, находящихся в спиралях,

отдаленных от спирали 38 23S рРНК. Так, повышалась реакционная способность оснований G2529 (Рисунок 5D) и G2751 (Рисунок 5E), находящихся на концах спиралей 91 и 97 23S рРНК, соответственно.

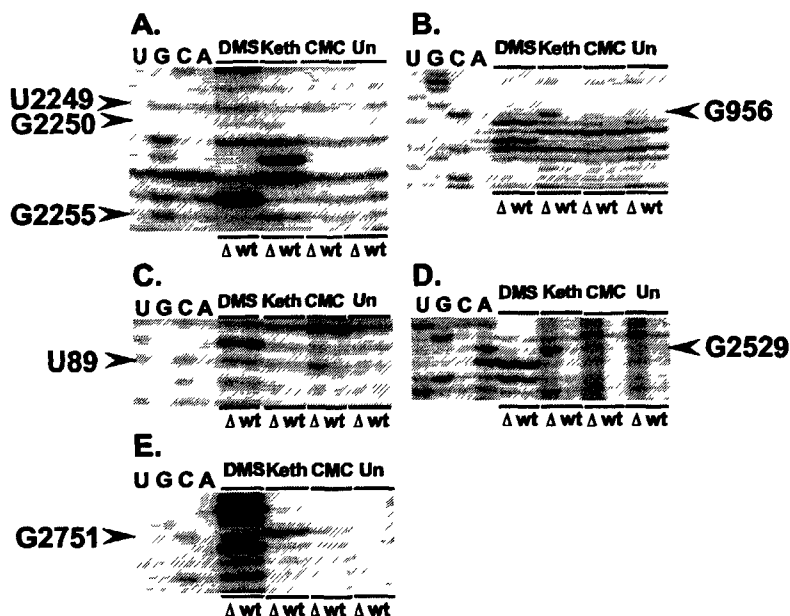


Рисунок 5. Химический пробинг структуры 70S рибосом *E. coli*, несущих мутацию ΔB1a. Показаны радиоавтографы продуктов обратной транскрипции модифицированной 5S рРНК и 23S рРНК с 5'-радиоактивно меченных праймеров, разделенных электрофорезом в 10% полиакриламидном геле. Линии соответствуют: U, G, C, A – сиквенсу; DMS – модификация диметилсульфатом; Keth – кетоксалем; CMC – карбодимидом; Un – немодифицированной рРНК. Δ и wt соответствуют мутантным ΔB1a рибосомам и рибосомам дикого типа. Остановки обратной транскриптазы соответствуют нуклеотидам, чья реакционная способность увеличивалась в результате мутации ΔB1a.

Анализ изменений реакционной способности оснований нуклеотидов 23S рРНК позволяет сделать вывод о том, что при разрушении B1a мостика изменяют свою структуру несколько функционально важных регионов 23S рРНК (рисунок 6).

Спираль 38 23S рРНК образует контакт с 5S рРНК и спиралью 81, которая, в свою очередь, контактирует со спиралью 39 23S рРНК. Нуклеотид G956, который находится в петле спирали 39, становится более реакционноспособным по отношению к кетоксалу при укорочении спирали 38. Спираль 81 23S рРНК образует третичный контакт с нуклеотидом G2255, который находится в спирали 80 (Р-петле) и реакционная способность которого также повышается.

Другой нуклеотид Р-петли, на который влияет мутация в А-сайте пальце – G2250 взаимодействует со спиралью 39 23S рРНК. Нуклеотид U89, реакционная способность которого по отношению к кетоксалу повышается, находится в D-петле 5S рРНК, которая располагается в кармане, образованном спиралью 42, поддерживающей центр, ассоциированный с ГТРазной активностью, спиралью 39 и 89 23S рРНК (Рисунок 6В).

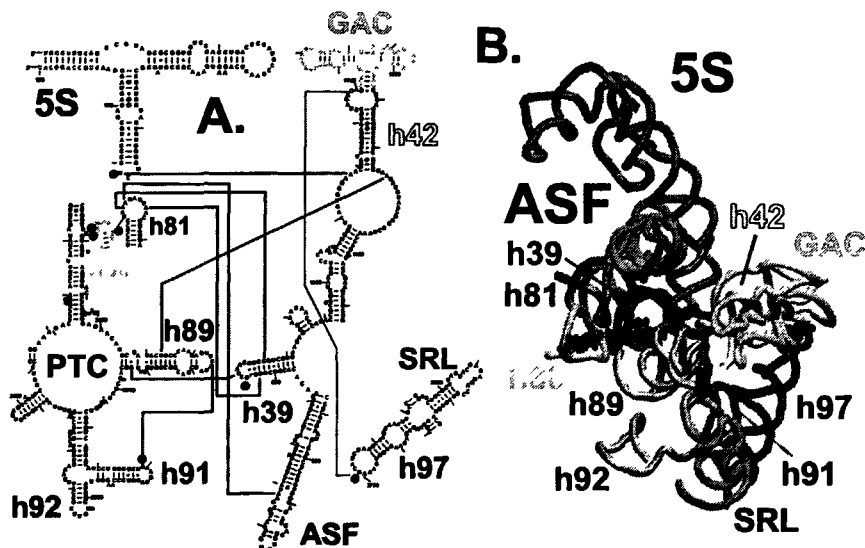


Рисунок 6. Структурные изменения в функционально важных участках рибосомы. А. Вторичная структура 5S рРНК и части 23S рРНК *E.coli*. Отмечены номера спиралей, обсуждаемых в тексте. PTC – пептидилтрансферазный центр. SRL – спираль 95 23S рРНК или сарцин-рициновая петля. Кругжками отмечены основания, реакционная способность которых возросла при мутации $\Delta B1a$. Линии отображают третичные взаимодействия нуклеотидов рРНК. В. Расположение элементов вторичной структуры и нуклеотидов в большой субъединице рибосом *H. marismortui*, вид со стороны малой субъединицы. Черными ван-дер-ваальсовыми сферами показаны нуклеотиды 23S и 5S рРНК *E. coli*, реакционная способность которых увеличивалась при мутации $\Delta B1a$ в рибосоме.

Таким образом, пробинг структуры позволяет выявить серию взаимосвязанных элементов рибосомы, которые находятся непосредственно над пептидилтрансферазным центром и включают в себя его часть – Р-петлю. Изменения реакционной способности в данном регионе являются скорее незначительными, что свидетельствует о том, что укорочение спирали 38 23S рРНК не разрушает полностью структуру Р-петли и близлежащих элементов 23S рРНК, а, скорее всего, смещает равновесие между альтернативными третичными структурами. Такая интерпретация соответствует слабому влиянию мутации $\Delta B1a$ на функции рибосомы *in vitro*.

Наибольший интерес вызывает влияние укорочения спирали 38 на элементы 23S рРНК, расположенные близко к центру связывания элонгационных факторов. Так, нуклеотид G2751 спирали 97 23S рРНК, который изменяет свою реакционную способность по отношению к кетоксало, образует третичный контакт со спиралью 42 23S рРНК, поддерживающей GAC, спираль 97, в свою очередь, располагается под “локтем” спирали 42. Длинный стебель 23S рРНК, который составляют спирали 95, 96 и 97, несет структурный элемент, который взаимодействует с элонгационными факторами – сарцин-рициновую петлю (спираль 95 23S рРНК), контактирующий с кончиком спирали 91, содержащей другой остаток, реакционная способность которого повышается при укорочении А-сайтового пальца – G2529. Данный нуклеотид образует высококонсервативную неканоническую обращенную Уотсон-Криковскую пару с основанием нуклеотида C2475 спирали 89 23S рРНК, которая соединяет пептидилтрансферазный центр, спираль 39, спираль 42 23S рРНК и 5S рРНК (Рисунок 6В).

Таким образом, мы обнаружили, что укорочение спирали 38 23S рРНК замедляет рост клеток, влияет на ассоциацию субчастиц и понижает GTPазную активность EF-G, индуцированную рибосомой или ее комплексом с деацилированной тРНК. При этом оно не летально для клеток, не вызывает изменений в принципиальных стадиях элонгационного цикла, а также не влияет на способность деацилированной тРНК, связанной в Р-участке, стимулировать GTPазную активность EF-G. Пробинг структуры рибосом, содержащих мутацию в спирали 38 23S рРНК показал, что В1а мостик, образованный спиралью 38 23S рРНК, может влиять на формирование третичных контактов, соединяющих 5S рРНК со структурными компонентами пептидилтрансферазного центра и элементами, взаимодействующими с элонгационными факторами.

Таким образом, локальные изменения структуры передаются по цепям элементов рибосомы на большие расстояния, при этом она, вероятно, использует множественные альтернативные пути коммуникации между функциональными центрами, и потеря одних взаимодействий может компенсироваться другими. Так, по-видимому, укорочение спирали 38 23S рРНК, разрушающее В1а мостик, приводит к тому, что его роль начинают выполнять мостики В1b и В1c.

2. Исследования 5S рРНК

5S рРНК – основной компонент центрального протуберанца большой субъединицы рибосомы. Она не является частью каких-либо функциональных центров рибосомы, однако расположена так, что может связывать эти центры и быть промежуточным звеном в передаче аллостерического конформационного сигнала. Голова 5S рРНК находится в верхней части центрального протуберанца 70S рибосомы и с его внутренней стороны контактирует с белком L5, который образует консервативный В1b/c (В1b) межсубъединичный мостик с

белком малой субъединицы S13. D-петля 5S рРНК взаимодействует с карманом, образованным спиралью 42, поддерживающей центр, ассоциированный с GTPазной активностью, спиралью 39 и 89 23S рРНК.

Исследования 5S рРНК проводились совместно с лабораторией доктора Джонатана Динмана на факультете Клеточной Биологии и Молекулярной Генетики Университета штата Мэрилэнд, Колледж Парк, США. В этой лаборатории была получена библиотека высококопийных дрожжевых плазмид рJD106.Тгр, содержащая 246 из 363 возможных мутантных аллелей 5S рРНК *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1. Фенотип мутаций в 5S рРНК *Saccharomyces cerevisiae*

Для исследований был выбран штамм NOY1049, в котором все хромосомные повторы 5S рДНК удалены из генома и который содержит только одну копию всех рРНК генов - *RDNI* на плазмиде рNOY353. После серии генетических манипуляций был получен штамм JD1253, содержащий плазмиды рJD373.Leu и рJD106.Тгр, при этом большие рибосомные РНК были закодированы на плазмиде рJD373.Leu, а 5S рРНК синтезировалась с плазмиды рJD106.Тгр, которая несла ген 5S рРНК, содержащий ту или иную точечную мутацию. Среди всех 246 мутаций в этом гене только 7 оказались нелетальными для клеток: A20C, C69U, A76U, A79U, U81C, A84G и C93U.

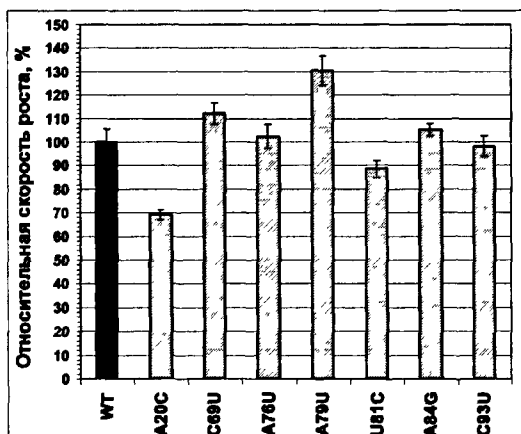


Рисунок 7. Относительные скорости роста клеток штамма JD1253- рJD106.Тгр. Мутантная 5S рРНК вырабатывается с плазмиды рJD106.Тгр. WT – штамм JD1253-рJD180.Ura.

Для полученных штаммов были определены времена удвоения и рассчитаны относительные скорости роста - величины обратные временам удвоения, нормированные на скорость роста штамма, вырабатывающего рибосомы дикого типа (Рисунок 7). Скорость роста замедлена в клетках, продуцирующих рибосомы, несущие мутации A20C и U81C в 5S рРНК.

Из клеток всех штаммов были выделены рибосомы,

5S рРНК которых была проанализирована методом обратной транскрипции. Эксперимент показал, что полученные штаммы вырабатывают мутантные рибосомы, а примесь рибосом дикого типа не превышает 4% (Рисунок 8).

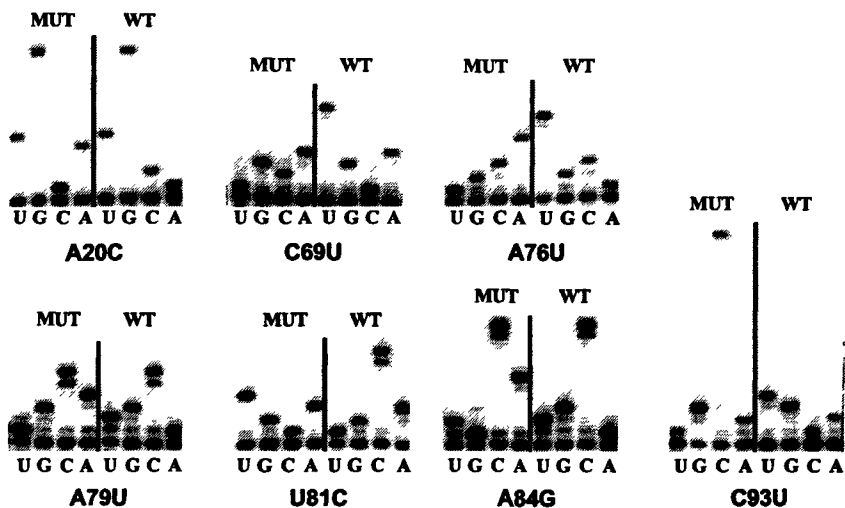


Рисунок 8. Анализ соотношения мутантной 5S рРНК (штаммы JD1253- рJD106.Тр) к 5S рРНК дикого типа (JD1253-рJD180.Уга), выделенной из клеток соответствующих штаммов. Показаны радиоавтографы разделенных в 10% ПААГ продуктов обратной транскрипции рРНК в присутствии смеси dNTP (три из четырех) и ddNTP (четвертого). Праймеры выбирались так, что продукты их удлинения должны различаться в зависимости от того, какой нуклеотид находится в месте мутации. *MUT* – соответствует мутантной 5S рРНК, *WT* – 5S рРНК дикого типа. *U, G, C, A* соответствуют остановке реакции обратной транскрипции напротив соответствующего нуклеотида 5S рРНК.

2.2. Эффективности программируемого сдвига рамки считывания для рибосом *Saccharomyces cerevisiae*, несущих точечные мутации в 5S рРНК

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* это удобный объект для количественной характеристики эффективности сдвига рамки считывания. Последовательности НК вирусов (например, L-A или HIV-1) или *Ty1*, *Ty3* элементов дрожжей содержат участок запрограммированного сдвига рамки считывания. При трансляции таких последовательностей в *Saccharomyces cerevisiae* наблюдается сдвиг рамки считывания.

В предыдущих исследованиях было показано, что экспрессия мутантных 5S рРНК аллелей с высококопийных плазмид может вызывать фенотип повышенной частоты +1 или -1 программируемого сдвига рамки считывания. Так как, в соответствии с полученными нами результатами, только 7 штаммов, которые продуцируют мутантные по 5S рРНК рибосомы, жизнеспособны, в лаборатории доктора Динмана был использован дрожжевой штамм JD1111, который содержит 4 хромосомных копии гена 5S рРНК – *RDN5*. Данный штамм был трансформирован плазмидами рJD106.Тр из исходной библиотечки. Анализ 5S рРНК, выделенной из таких штаммов, показал, что соотношение рибосом, несущих мутантную 5S рРНК, к рибосомам дикого типа находится в интервале от 1:10 до 1:1. Для полученных

штаммов с помощью дрожжевых векторов на основе моноцистронного репортерного гена *LacZ* нашими коллегами была рассчитана эффективность программируемого сдвига рамки считывания.

Для расчета эффективности программируемого сдвига рамки считывания трансляции в штаммах JD1253, которые продуцируют 5S рРНК только с плазмиды рJD106.Тгр, несущей точечные мутации в гене 5S рРНК, был использован метод на основе бицистронного репортерного гена, кодирующего люциферазы *Renilla reniformis* и *Photinus pyralis* (Рисунок 9). Синтез второго репортерного белка – люциферазы *Photinus pyralis* в тестовой плазмиде происходит только в случае сдвига рамки считывания за счет сигнальной последовательности “+1 или -1 сдвига”, клонированной с 5'-конца гена *fluc* (Рисунок 8В).

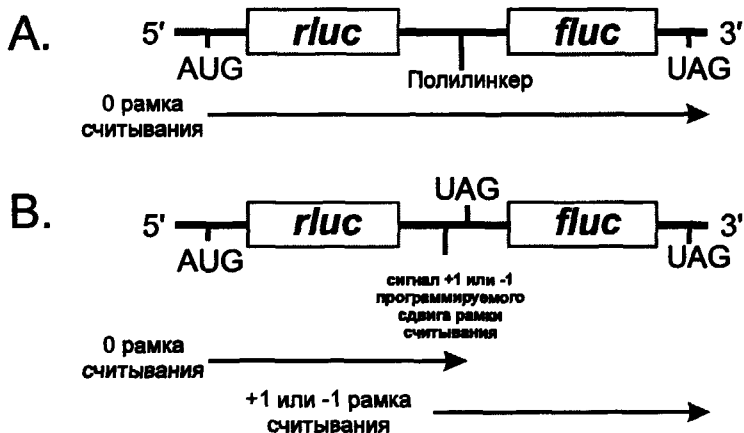


Рисунок 9. Система для количественного анализа программируемого сдвига рамки считывания в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* на основе репортерных генов люцифераз *Renilla reniformis* (*rluc*) и *Photinus pyralis* (*fluc*). AUG-старт кодон, UAG – стоп кодон. А. Контрольная плазмид, в которой происходит синтез люцифераз Rluc и Fluc, сигнал сдвига отсутствует. В. Тестовая плазмид, в которой синтез Fluc происходит только в результате программируемого сдвига рамки считывания, сигнал сдвига клонирован с 5'-конца гена *fluc*.

Исходные штаммы трансформировали плазмидами, в которых клонированы сигналы сдвига -1 вируса L-A – рYDL-LA и сдвига +1 *Ty1* элемента дрожжей рYDL-TY1, регистрировали соотношение активностей люминисценции люцифераз *Renilla reniformis* и *Photinus pyralis* – *Fa/Ra* и рассчитывали эффективности программируемого сдвига рамки считывания по формуле $\text{Эффективность} = [(Fa^{\text{тест}}/Ra^{\text{тест}})/(Fa^{\text{контроль}}/Ra^{\text{контроль}})]$. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Эффективность -1 и +1 программируемого сдвига рамки считывания для штаммов JD1253- pJD106.Trp, рассчитанная с помощью метода двух репортерных генов лоцифераз. WT – штамм JD1253-pJD180.Uga.

Мутация	Эффективность +1 программируемого сдвига рамки считывания $\pm$ ошибка расчета, %	Эффективность -1 программируемого сдвига рамки считывания $\pm$ ошибка расчета, %
WT	11,05 $\pm$ 0,14	10,30 $\pm$ 0,14
A20C	12,10 $\pm$ 0,70	15,13 $\pm$ 0,15
C69U	12,50 $\pm$ 0,12	15,90 $\pm$ 0,20
A76U	9,82 $\pm$ 0,31	11,10 $\pm$ 0,26
A79U	14,13 $\pm$ 0,24	16,50 $\pm$ 0,28
U81C	13,10 $\pm$ 0,77	17,30 $\pm$ 0,54
A84G	14,20 $\pm$ 0,44	16,80 $\pm$ 0,35
C93U	14,22 $\pm$ 0,43	16,60 $\pm$ 0,34

Изменение эффективности программируемого сдвига рамки считывания в случае мутаций в 5S рРНК может быть объяснено со структурной точки зрения. Для этого необходимо рассмотреть расположение 5S рРНК в рибосоме и локализацию в пространстве нуклеотидов, изменение которых приводило к тем или иным фенотипическим проявлениям. К сожалению на данный момент не описано ни одной детальной трехмерной модели 5S рРНК в составе 80S рибосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Сравнение крио-электронной модели 80S рибосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с моделью структуры большой субчастицы *Haloarcula marismortui* не выявило значительных различий в структуре и положении 5S рРНК и основных элементов большой рРНК, поэтому представляется целесообразным рассмотреть пространственное расположение тех или иных нуклеотидов 25S и 5S рРНК 80S рибосом *Saccharomyces cerevisiae* на модели структуры большой субчастицы *Haloarcula marismortui*.

Согласно обобщенной модели сдвига рамки считывания трансляция события -1 и +1 сдвига рамки происходит на разных стадиях элонгационного цикла. Так, предположено, что -1 сдвиг рамки считывания происходит во время или сразу после аккомодации, но перед транслокацией, а +1 сдвиг рамки считывания происходит в посттранслокационном состоянии, то есть на стадии, когда А участок рибосомы свободен.

Анализ данных по эффективности программируемого сдвига рамки считывания, рассчитанной для штаммов, продуцирующих как только мутантные по 5S рРНК рибосомы, так и мутантные рибосомы в смеси с рибосомами дикого типа, позволяет сделать вывод о том, что мутации в “голове” 5S рРНК понижают эффективность -1 программируемого сдвига рамки считывания (Рисунок 10А, нуклеотиды выделены белым) и, одновременно, повышают эффективность +1 программируемого сдвига (Рисунок 10В, нуклеотиды выделены черным). Согласно обобщенной модели такой эффект может быть объяснен стабилизацией

посттранслокационного состояния, что должно понижать эффективность -1 и повышать эффективность +1 программируемого сдвига. Белок L5 (yL11) взаимодействует с "головой" 5S рРНК и с тРНК, связанной в Р-участке. Мутации в "голове" 5S рРНК могут разрушать консервативную сеть водородных связей между атомами белка и 5S рРНК, приводя к нарушению контактов между 5S рРНК и L5. Это может негативно влиять на прохождение структурных перестроек в рибосоме, происходящих при связывании EF-Tu и необходимых для дальнейшей трансляции. При этом посттранслокационное состояние будет стабилизировано.

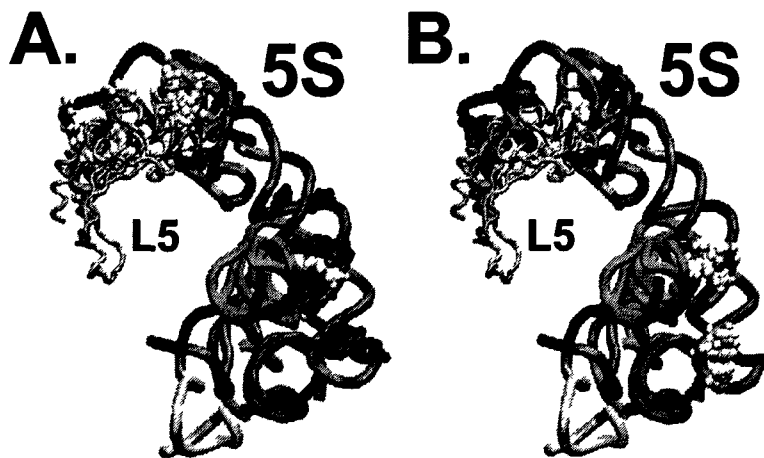


Рисунок 10. Расположение нуклеотидов рибосом *H. marismortui*, соответствующих нуклеотидам 5S рРНК *Saccharomyces cerevisiae*, мутации в которых влияют на сдвиг рамки считывания. А. -1 программируемый сдвиг рамки считывания. В. +1 программируемый сдвиг рамки считывания. Черными ван-дер-ваальсовыми сферами показаны нуклеотиды, мутации в которых увеличивают, белыми - уменьшают эффективность программируемого сдвига рамки считывания по сравнению с рибосомами дикого типа. Отмечены результаты экспериментов по расчету эффективности для штаммов, продуцирующих только мутантные по 5S рРНК рибосомы (Таблица 1), и мутантные рибосомы в смеси с рибосомами дикого типа.

Эффекты мутаций в нижней части 5S рРНК прямо противоположны эффектам в "голове" 5S рРНК. Мутации в нижней части 5S рРНК повышают эффективность -1 (Рисунок 10А, нуклеотиды выделены черными), и понижают эффективность +1 программируемого сдвига рамки считывания (Рисунок 10В, нуклеотиды выделены белыми). D-петля 5S рРНК связана с GAC и SRL через спирали 25S рРНК. Мутации в нижней части 5S рРНК, вероятно, могут влиять на относительное положение этих элементов. Тогда, согласно обобщенной модели сдвига рамки считывания, наблюдаемое изменение эффективностей программируемого сдвига рамки считывания может быть объяснено понижением способности связывания eEF-2 (EF-G) и повышением эффективности связывания eEF-1 (EF-Tu) с рибосомой.

2.3. Структурные изменения в рибосомах *Saccharomyces cerevisiae* при мутациях в 5S рРНК

Единственным источником 5S рРНК в штамме JD1253 является плазмида pJD106.Тр, которая содержит мутантный ген 5S рРНК. Из таких штаммов были выделены рибосомы. Структурные изменения в рибосомной 25S рРНК и 5S рРНК *Saccharomyces cerevisiae* определялись методом химического пробоянга. Были найдены изменения как в 5S, так и в 25S рРНК.

Нелетальные мутации располагаются равномерно по всей молекуле 5S рРНК, при этом все 7 из них вызывают уменьшение реакционной способности того или иного из нуклеотидов G85, G91 и G92, которые располагаются в нижнем домене 5S рРНК (Рисунок 11В; Рисунок 12). Наибольший эффект был получен для мутаций A20C и U81C (Рисунок 12). Замена пары оснований А-У на С-У при мутации A20C должна дестабилизировать спираль II и, напротив, замещение G-U пары на более стабильную G-C пару стабилизировать спираль IV 5S рРНК (Рисунок 11В). Вероятно, даже такие незначительные изменения могут передаваться на отдаленный в пространстве регион спираль IV и D-петлю 5S рРНК. Этот регион взаимодействует со спиралью 39, 89 и 42 25S рРНК, которые являются частью системы третичных контактов, связывающих 5S рРНК, А-сайт пальца и структурные элементы пептидилтрансферазного центра и центра связывания элонгационных факторов.

Мутации A20C и U81C вызывают изменения в спирали 95 25S рРНК: сарцин-рициновой петле (Рисунок 12). Так, уменьшается реакционная способность G3027, соответствующего нуклеотиду G2661 у *E.coli*, основание которого защищается от химической модификации при связывании как EF-G, так и EF-Tu. Кроме того, незначительно уменьшается реакционная способность основания нуклеотидного остатка G3013, который лежит в основании спирали 95 25S рРНК и находится близко к месту контакта SRL и белка L3. Интересно, что штаммы, продуцирующие рибосомы с мутациями A20C и U81C, имели пониженную скорость роста, что может объясняться дефектами в структуре рибосомы, вызванными данными мутациями.

Сарцин-рициновая петля всегда занимает одну и ту же позицию как на крио-электронных реконструкциях, так и на всех доступных атомных структурах большой рибосомной субъединицы из различных организмов. Изменение реакционной способности оснований нуклеотидов G3027 и G3013 сарцин-рициновой петли, вероятно, может быть связано с движением спирали 91, которая через консервативную пару оснований C2843-G2897 (C2475-G2529 у *E. coli*) взаимодействует со спиралью 89 25S рРНК.

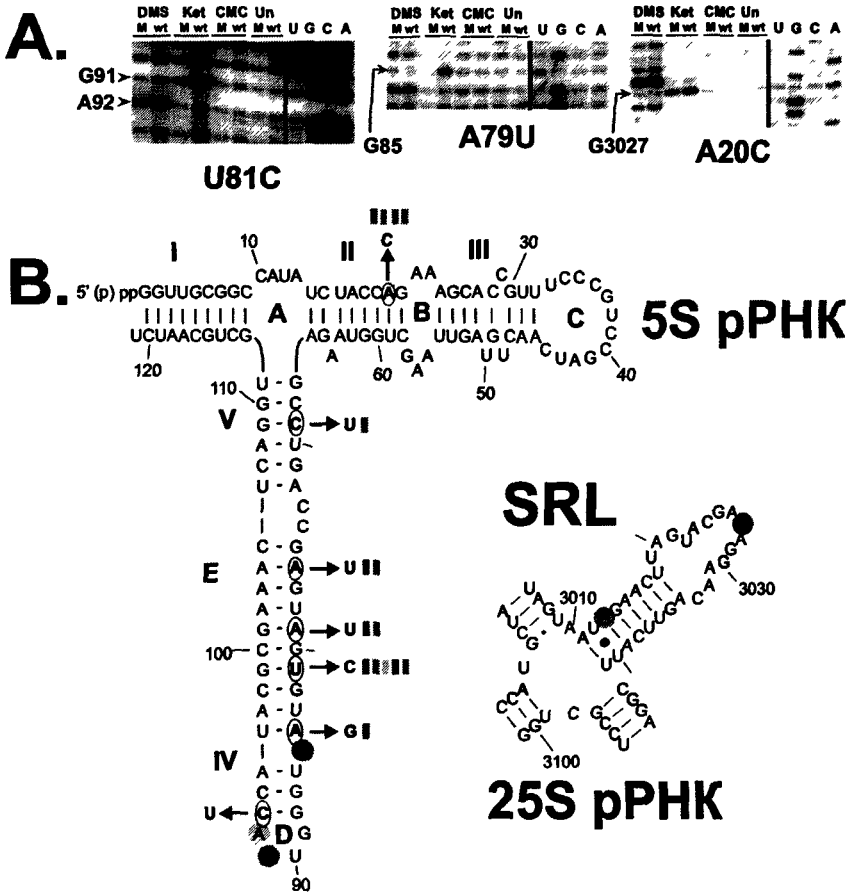


Рисунок 11. Химический пробнг структуры 80S рибосом *Saccharomyces cerevisiae*, несущих точечные мутации в 5S рРНК. **А.** Радиоавтографы продуктов обратной транскрипции модифицированной 5S рРНК и 25S рРНК с 5'-радиоактивно меченных праймеров, разделенных электрофорезом в 10% полиакриламидном геле. Линии соответствуют: U, G, C, A – сиквенсу; DMS – модификации диметилсульфатом; Keth – кетоксалем; CMC – карбодимидом; Un – немодифицированной рРНК. М и wt соответствуют мутантным рибосомам и рибосомам дикого типа. Остановки обратной транскриптазы соответствуют нуклеотидам, чья реакционная способность увеличивалась в результате мутации соответствующих нуклеотидов в 5S рРНК. **В.** Вторичная структура 5S рРНК (отмечены номера спиралей и доменов) и спирали 95 25S рРНК (SRL) *Saccharomyces cerevisiae*. Окружностями показаны мутации в 5S рРНК (стрелка и соответствующая мутация), которые были исследованы в данной работе. Цветными прямоугольниками напротив показано, какие из мутантов вызывают увеличение реакционной способности нуклеотидов 5S или 25S рРНК, которые отмечены кружочками соответствующего цвета.

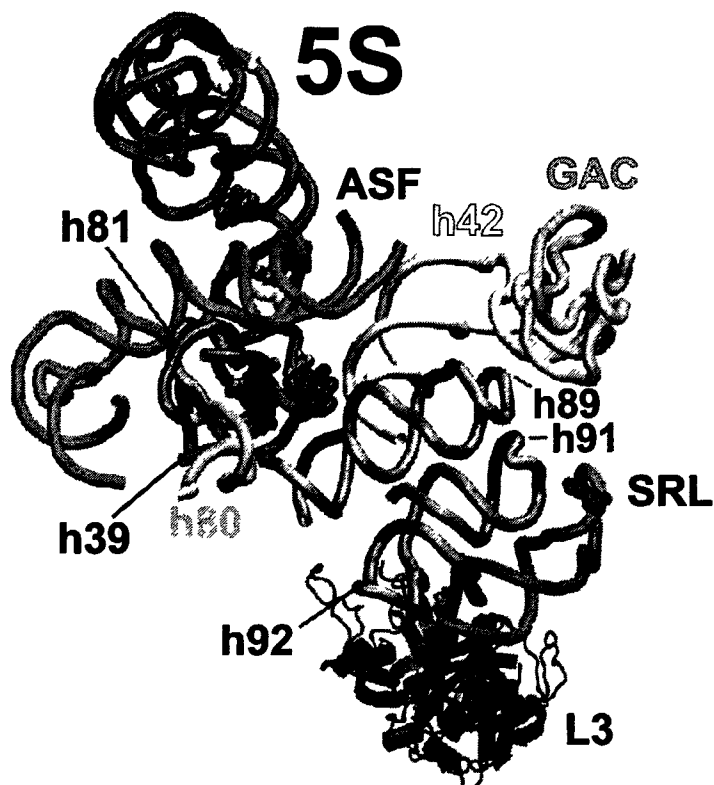


Рисунок 12. Изменение реакционной способности оснований 5S и 25S рРНК, вызванные мутациями в 5S рРНК, отмеченные на детальной атомной структуре 50S субчастицы *H. marismortui*. Черными ван-дер-ваальсовыми сферами выделены нуклеотиды, основания которых изменяют реакционную способность при мутациях в 5S рРНК, белыми выделены нуклеотиды A20 и U81, серыми выделены остальные нуклеотиды 5S рРНК, мутации оснований которых оказались нелетальными для клеток.

Для 5S рРНК в литературе были предложены различные функции. Полагают, что она увеличивает сродство аминоацил-тРНК к рибосоме, помогает в формировании правильной геометрии пептидилтрансферазного центра, или увеличивает пептидилтрансферазную активность. Еще до получения структуры 50S субчастицы с высоким разрешением возникла гипотеза о том, что 5S рРНК может связывать функциональные центры рибосомы и передавать между ними конформационный сигнал и, в частности, соединять пептидилтрансферазный центр и центр, ассоциированный с GTPазной активностью.

Структурные изменения в рибосомах *Saccharomyces cerevisiae*, которые вызывают мутации в 5S рРНК, скорее можно отнести к категории слабых. Однако, вместе с результатами о летальности большинства (239 из 246) мутаций в 5S рРНК для клетки, они четко свидетельствуют о том, что 5S рРНК является высокоструктурированной и консервативной молекулой. Даже незначительные изменения в ее доменах могут передаваться в район D-петли, который взаимодействует с карманом, образованным спиралью 42, поддерживающей центр, ассоциированный с GTPазной активностью и спиралями 39 и 89 25S рРНК. Если идея об аллостерической связи структурных элементов рибосомы верна, то “голова” 5S рРНК может влиять на конформацию “нижней” части молекулы. Таким образом, структурные изменения в области центрального протуберанца большой субъединицы, например, во время относительного поворота субчастиц при транслокации или при переходе малой субъединицы из “открытого” состояния в “закрытое” при декодировании, могут передаваться с “головы” 5S рРНК на D-петлю молекулы, а через нее на другие структурные элементы рибосомы, что подтверждается полученными в этой работе данными о том, что мутации в 5S рРНК могут потенциально влиять на третичные контакты между спиралями 25S рРНК в 80S рибосоме *Saccharomyces cerevisiae*, связывающими структурные элементы пептидилтрансферазного центра и центра связывания элонгационных факторов.

ВЫВОДЫ

1. Укорочение спирали 38 23S рРНК, приводящее к разрушению В1а межсубъединичного мостика, замедляет рост клеток, влияет на ассоциацию субчастиц и понижает GTPазную активность EF-G, индуцированную рибосомой или ее комплексом с деацилированной тРНК, при этом оно не летально для клеток и не вызывает изменений в принципиальных стадиях элонгационного цикла.
2. Пробинг структуры рибосом, содержащих мутацию в спирали 38 23S рРНК, показал, что В1а мостик, образованный спиралью 38 23S рРНК, может влиять на формирование третичных контактов, соединяющих 5S рРНК со структурными компонентами пептидилтрансферазного центра и элементами, взаимодействующими с элонгационными факторами. Таким образом, локальные изменения структуры могут передаваться по цепям элементов рибосомы на большие расстояния.
3. Среди 246 точечных мутаций в 5S рРНК *Saccharomyces cerevisiae* только 7 оказались нелетальными для клеток: A20C, C69U, A76U, A79U, U81C, A84G и C93U.

4. Структурные изменения в различных доменах 5S рРНК могут передаваться в район D-петли 5S рРНК и на центр связывания элонгационных факторов в 80S рибосомах *Saccharomyces cerevisiae*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Sergiev PV, Lesnyak DV, Burakovsky DE, Kiparisov SV, Leonov AA, Bogdanov AA, Brimacombe R, Dontsova OA. (2005) Alteration in Location of a Conserved GTPase-associated Center of the Ribosome Induced by Mutagenesis Influences the Structure of Peptidyltransferase Center and Activity of Elongation Factor G. *J Biol Chem.* **280**, 31882-31889.
2. Sergiev PV, Kiparisov SV, Burakovsky DE, Lesnyak DV, Leonov AA, Bogdanov AA, Dontsova OA. (2005) The Conserved A-site Finger of the 23S rRNA: Just One of the Intersubunit Bridges or a Part of the Allosteric Communication Pathway? *J Mol. Biol.* **353**, 116-123.
3. Kiparisov S, Petrov A, Meskauskas A, Sergiev PV, Dontsova OA, Dinman JD. (2005) Structural and functional analysis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* **274**, 235-247.
4. Sergiev P. V., Kiparisov S. V., Leonov A.A., Bogdanov A. A., Brimacombe R., Dontsova O. A. Mutations in ribosomal RNA that affect different stages of translation. 2004. Meeting of NHMI International Research scholars, Abstract book, p.79.
5. Кипарисов С.В., Лесняк Д.В., Бураковский Д.Е., Леонов А.А., Сергиев П.В. Изучение взаимодействий между функциональными центрами рибосомы. 2005. Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005». С. 80.
6. Dontsova O., Sergiev P., Kiparisov S., Lesnyak D., Burakovsky D., Bogdanov A. Communication between the elongation factor binding site and peptidyl-transferase centers of the ribosome. 2005. EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control. Abstract book, p. 48.

№ 20 194

РНБ Русский фонд

2006-4

23071

Подписано в печать 26 октября 2005 г.

Заказ 508. Формат 60 x 90/16.

Тираж 100 экз.

Отпечатано в салоне оперативной печати ПКФ.

Москва, Садовая-Черногрозская, 3Б.