

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

---

Химический факультет

*На правах рукописи*

**ИВАНОВ ПАВЕЛ ВАЛЕРЬЕВИЧ**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ТРАНСПОРТНО-МАТРИЧНОЙ РНК *Escherichia coli***

02.00.10 - биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва - 2003 г.

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, в Институте молекулярной генетики им. М. Планка, Берлин, Германия.

Научные руководители: д.х.н., проф. Донцова Ольга Анатольевна  
к.х.н., с.н.с. Шпанченко Ольга Валерьевна

Научный консультант: проф. Кнуд Ниерхаус

Официальные оппоненты: д.х.н., проф. Готтих Борис Павлович  
д.б.н. Аграновский Алексей Анатольевич

Ведущая организация: Институт Биологии Гена РАН

Защита состоится 23 декабря 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: 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, лабораторный корпус "А", аудитория 501.

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

Автореферат разослан 21 ноября 2003 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Смирнова И.Г.

2003-А  
21290

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Важнейшие клеточные процессы, такие как трансляция, транскрипция, процессинг и т.д., основаны на функционировании РНК и РНК-белковых комплексов, что вызывает повышенный интерес к изучению функции РНК и рибонуклеопротеидов. В последнее время появилась информация о важной роли так называемых малых РНК в различных процессах, таких как регуляция экспрессии генов, поддержание клеточного гомеостаза и т.д.

Одним из примеров малых стабильных РНК является транспортно-матричная РНК (тмРНК). Эта уникальная молекула РНК выполняет в клетках зубактерий целый ряд функций. В частности, в ходе процесса *транс*-трансляции тмРНК освобождает рибосомы, „арестованные“ на 3'-конце матричной РНК, лишенной стоп-кодона, добавляет на С-конец недосинтезированных белков сигнальную последовательность (тагирует белки) и тем самым направляет их на деградацию с помощью специфических протеаз клетки.

В настоящее время детальной информации о молекулярном механизме *транс*-трансляции и о механизме взаимодействия тмРНК с рибосомой не существует. Для получения такой информации необходимо исследовать комплексы тмРНК с рибосомой на определенных стадиях *транс*-трансляции.

Настоящая работа посвящена изучению структуры и функции транспортно-матричной РНК *Escherichia coli*.

Цель работы. В ходе выполнения данной работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучение роли 3'-ССА конца тмРНК в формировании комплекса с фактором элонгации трансляции Tu в GDP форме;
2. Изучение структуры тмРНК в растворе и построение модели движения тмРНК в рибосоме;
3. Поиск структурных элементов тмРНК, необходимых для взаимодействия с рибосомой;
4. Изучение роли некоторых высококонсервативных нуклеотидов в функционировании тмРНК;
5. Разработка метода выделения комплекса тмРНК, взаимодействующей с рибосомой на определенных этапах *транс*-трансляции.

Научная новизна и практическая значимость. Методом фотоаффинного химического сшивания определено, что универсальный 3'-ССА конец транспортно-матричной РНК не участвует в формировании необычного функционального комплекса тмРНК•EF-Tu•GDP. Показано, что тмРНК без 3'-ССА конца, также как деацилированная и аминоклапированная формы тмРНК, способна формировать комплекс с

РОС. НАУЧ. БИБЛИОТЕКА  
С.Петербург  
09 300 акт 852

элонгационным фактором Tu в GDP форме, что позволяет говорить о различной природе взаимодействия фактора элонгации Tu с тРНК и тмРНК.

Методами фотоаффинного химического сшивания с последующим анализом продуктов сшивания была получена информация о структуре тмРНК в растворе. В частности, показана двумерная организация молекулы тмРНК и предложена модель прохождения тмРНК через рибосому в ходе *транс*-трансляции.

С помощью сайт-специфического мутагенеза и случайного мутагенеза *in vivo* с последующим определением функциональной активности тмРНК *in vivo* осуществлен поиск структурного элемента тмРНК, мимикрирующего кодон-антикодоновый дуплекс мРНК и тРНК, необходимый для взаимодействия с декодирующим центром рибосомы. Показано, что область тмРНК, соответствующая антикодоновой петле тРНК, не взаимодействует с декодирующим центром рибосомы и не участвует в формировании такого структурного элемента.

Показано, что высококонсервативные нуклеотиды 85-86UA и 300-301UA тмРНК важны для функциональной активности тмРНК.

Разработан метод выделения комплексов тмРНК с рибосомой, соответствующих разным этапам *транс*-трансляции. Выделены комплексы тмРНК с рибосомой для изучения структуры комплексов методом криоэлектронной микроскопии.

Апробация работы Материалы работы были представлены на Международной Конференции "Trends in nucleic acid chemistry" (Москва, Россия, 2000), Международной Конференции в честь А.С. Спирина "Protein Synthesis" (Пушино, Россия, 2001), Пятом Международном Форуме "Recognition Studies in Nucleic Acids" (Шеффилд, Англия, 2001), Пятой Международной Конференции памяти В.А. Энгельгардта (Москва, Россия, 2001), Международной Конференции "The dynamics of Ribosome structure and Function" (Квинстаун, Новая Зеландия, 2002), Восьмой Ежегодной Конференции "RNA 2003" (Вена, Австрия, 2003), Шестой Международной Конференции "Ribosome Synthesis 2003" (Аркашон, Франция, 2003), а также доложены и обсуждены на семинарах лаборатории химии нуклеопротеидов, кафедры Химии Природных соединений, Института молекулярной генетики им. М. Планка (Берлин, Германия), Группы трансляционного контроля Европейской Молекулярно-Биологической Лаборатории (Гейдельберг, Германия) и Группы криоэлектронной микроскопии Imperial College (Лондон, Англия)

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

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## 1. Неканонический комплекс между тмРНК и EF-Tu

Ранее в нашей лаборатории в рамках проекта, посвященного изучению *транскрипции*, методами фотоаффинного химического сшивания было показано, что элонгационный фактор Tu является одним из белков, взаимодействующих с транспортно-матричной РНК. Из литературных данных известно, что главная функция элонгационного фактора Tu - формирование комплекса с аминокцилированной тРНК и GTP, в котором EF-Tu взаимодействует с аминокцилированным стеблем и Т-петлей аа-тРНК, а также защищает сложноэфирную связь от спонтанного гидролиза. Это позволило предположить, что во взаимодействии аминокцилированной тмРНК с EF-Tu также принимает участие 3'-конец акцепторного стебля.

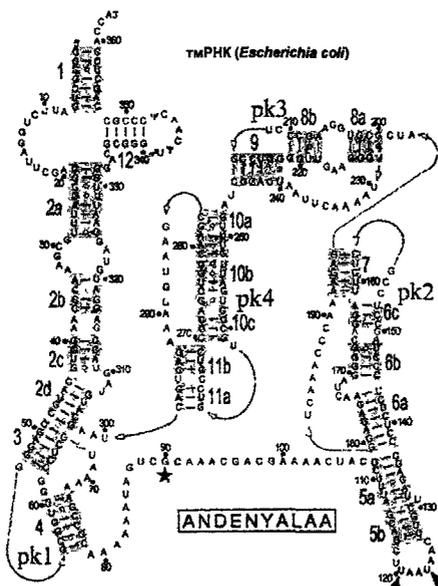


Рисунок 1. Модель вторичной структуры транспортно-матричной РНК *E. coli*.

Анализ нуклеотидных остатков тмРНК, участвующих в формировании обнаруженного в нашей лаборатории комплекса деацелированной тмРНК с фактором элонгации Tu•GDP, показал, что, по крайней мере, часть из них расположена вне тРНК-подобного района тмРНК, а именно в спирали 2 и псевдоузле 4 тмРНК (рис. 1). Однако, данный анализ не позволял детектировать участие собственно 3'-концевой части молекулы тмРНК в формировании сшивки. Поскольку одной из задач данной работы было выяснение необходимости ССА-конца тмРНК для формирования ее комплекса с EF-Tu•GDP, мы решили использовать тмРНК, лишенную этого участка.

При этом для детектирования образования комплекса использовался метод фотоаффинного химического сшивания. В качестве фотоаффинного реагента был выбран 4-тиоуридин. Включение остатков тиоуридина в РНК не влияет на биологическую функцию и на структуру данной РНК. Активация 4-тиоуридина происходит при облучении мягким ультрафиолетовым светом в условиях, не приводящих к деградации РНК и белков.

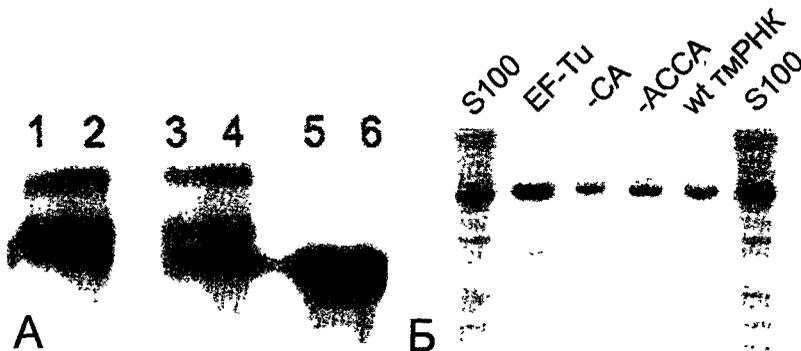


Рисунок 2. А. Анализ продуктов фотоаффинного химического сшивания с помощью ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка 1 - тмРНК без 3'-CA после облучения УФ светом в присутствии S100; Дорожка 2 - тмРНК без 3'-ACCA после облучения УФ светом в присутствии S100, Дорожка 3 - тмРНК дикого типа после облучения УФ светом в присутствии S100; Дорожка 4 - тмРНК дикого типа после облучения УФ светом в присутствии EF-Tu·GDP; Дорожка 5 - тмРНК дикого типа после облучения УФ светом в присутствии S100 и последующей обработки протеиназой К; Дорожка 6 - тмРНК дикого типа после облучения УФ светом в отсутствие EF-Tu или S100; Б. Анализ белкового компонента сшивки (дорожки 1-3 рисунка 2А) с помощью ПААГ в денатурирующих условиях после обработки РНКазой T<sub>1</sub>.

Для получения молекул тмРНК, лишенных 3'-ССА-конца, были созданы две конструкции, позволяющие в ходе *in vitro* транскрипции синтезировать молекулы тмРНК без двух (CA) или четырех (ACCA) терминальных нуклеотидов. Реакцию Т7 транскрипции проводили в присутствии 4-тиоуридина и радиоактивного  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-UTP. Уровень включения 4-тиоуридина составлял 2-5 остатков на молекулу тмРНК.

Для формирования РНК-белкового комплекса мутантные формы тмРНК и тмРНК дикого типа, которую использовали в качестве контроля, инкубировали в присутствии S100 экстракта (фракция растворимых белков клетки). После облучения УФ светом с длиной волны более 300 нм продукты фотоаффинного химического сшивания анализировали с помощью ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 2А). Видно, что эффективность сшивки для тмРНК дикого типа (рис. 2А, дор.3) и мутантных вариантов, лишенных 3'-CA- и 3'-ACCA-концов (рис. 2А, дор.1 и 2, соответственно), примерно одинакова. Выход сшивки составляет около 20%. Белковый компонент сшивки (дорожки 1-3) экстрагировали из геля в присутствии РНКазы T<sub>1</sub> и анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 2Б). Во всех

случаях в формировании шивки с тмРНК принимает участие один белок, и его подвижность в геле совпадает с подвижностью фактора элонгации Tu. Природа основного и более подвижных компонентов была установлена с помощью масс-спектрометрии. Это был элонгационный фактор Tu или его фрагменты. Это позволяет заключить, что универсальный 3'-ССА-конец транспортно-матричной РНК не участвует в формировании комплекса с фактором элонгации Tu в GDP форме.

В условиях проведения эксперимента, описанного выше, в формировании комплекса с EF-Tu•GDP принимает участие деацилированная тмРНК. Однако известно, что активной в *транс*-трансляции является Ala-тмРНК. Возможность формирования комплекса Ala-тмРНК•EF-Tu•GDP была проверена также методом фотоаффинного химического сшивания. Радиоактивно меченая [<sup>32</sup>P]-тмРНК, содержащая около 5 остатков 4-тиоуридина на молекулу, была аминоацилирована с использованием [<sup>14</sup>C]-аланина и использована в экспериментах по фотоаффинному химическому сшиванию с EF-Tu•GDP. Продукты сшивания анализировали электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях. В полосках, соответствующих продукту фотоаффинного химического сшивания и тмРНК, не принявшей участие в формировании шивки, определяли соотношение [<sup>32</sup>P]/[<sup>14</sup>C] (табл. 1). Видно, что содержание аминоацилированной тмРНК примерно одинаково в обоих образцах, следовательно, Ala-тмРНК участвует в комплексобразовании с EF-Tu•GDP столь же эффективно, как и деацилированная.

Таблица 1. Результаты эксперимента по фотоаффинному химическому сшиванию между EF-Tu•GDP и [<sup>14</sup>C] Ala-[<sup>32</sup>P]-тмРНК

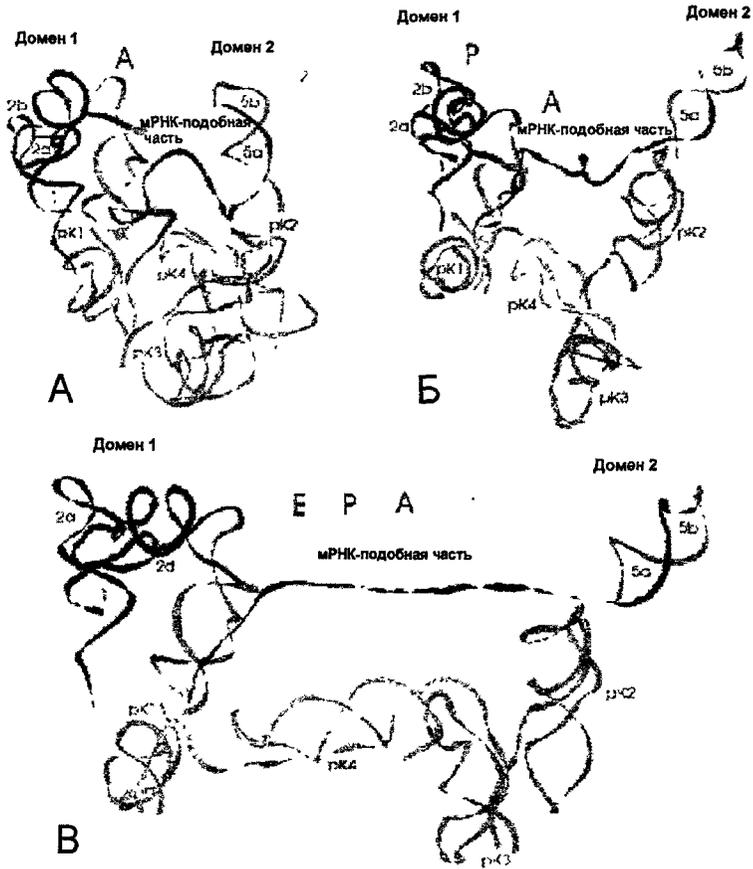
образец	соотношение [ <sup>32</sup> P]/ [ <sup>14</sup> C]	соотношение
шивка	1268/467	2.7:1
Ala-тмРНК	786/323	2.4:1

## 2. Модель взаимодействия тмРНК с рибосомой

Центральным вопросом в понимании механизма *транс*-трансляции является вопрос о том, как молекула тмРНК взаимодействует и движется в рибосоме.

Мы предполагаем, что тмРНК состоит из двух компактно свернутых доменов (включающих псевдоузлы), которые взаимодействуют со специфическими участками рибосомы и сохраняют эти контакты во время трансляции кодирующей части тмРНК (рис. 3А). Домен 1 сформирован тРНК-подобной областью, спиралью 2 и псевдоузлом 1. Он, возможно, необходим для вхождения тмРНК в рибосому и содержит в себе аминоацилированную тРНК-подобную часть, взаимодействующую с элонгационным

фактором Tu и SmpV с одной стороны, и элемент, который структурно мимикрирует кодон-антикодовый комплекс мРНК и тРНК, узнающийся А участком рибосомы, с другой стороны. Оставшиеся элементы данного домена, возможно, необходимы для модулирования формы комплекса тРНК и мРНК. Домен 2, мы полагаем, состоит из спирали 5 и псевдоузлов 2 и 4.



**Рисунок 3.** Модель пространственной структуры тмРНК. Показаны А, Р и Е участки рибосомы. Номера спирали и псевдоузлов соответствуют рис. 1.

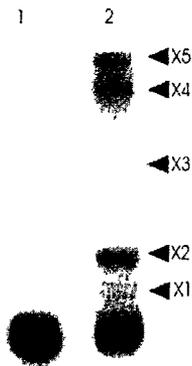
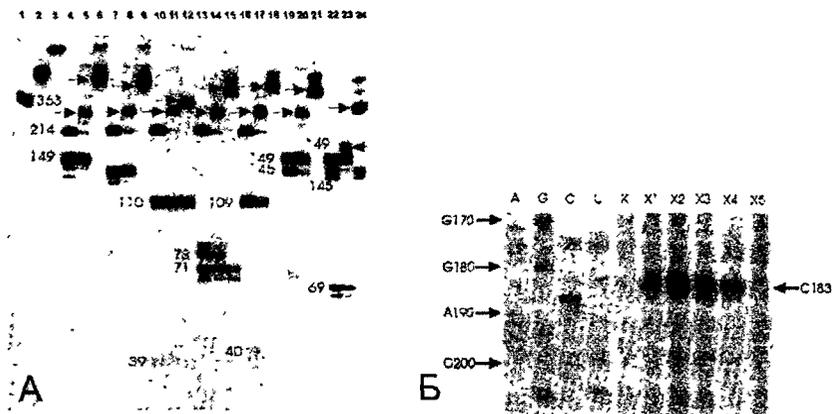


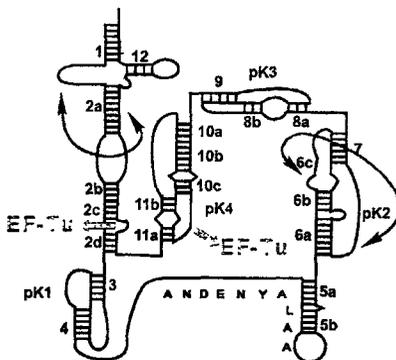
Рисунок 4. Гель-электрофоретический анализ продуктов фотоаффинного химического сшивания, содержащего 2-5 остатков 4-тиоуридина на молекулу тмРНК, после облучения УФ светом Дорожка 1, тмРНК без облучения УФ, дорожка 2, тмРНК, облученная УФ светом X1-5 – продукты фотоаффинного химического сшивания

Для проверки нашей гипотезы о двудоменной организации молекулы тмРНК мы применили метод фотоаффинного химического сшивания тмРНК со случайно распределенными по молекуле остатками 4-тиоуридина была облучена ультрафиолетовым светом с длиной волны более 300 нм. Облученный образец анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис 4). Было обнаружено, по крайней мере, 5 продуктов фотоаффинного химического сшивания. Данные продукты сшивки элюировали из геля. Для определения нуклеотидных остатков, принимающих участие в формировании сшивок, использовали стандартные подходы анализа продуктов фотоаффинного химического сшивания (анализ с помощью РНКазы H и метод обратной транскрипции), ранее неоднократно и успешно использованные в нашей лаборатории. Пример такого анализа приведен на рис 5

Продукт фотоаффинного химического сшивания X5 локализован в тРНК-подобной части тмРНК и связывает уридины 15-16 с последовательностью нуклеотидов 325-345 тмРНК. Продукты X1-X3 содержат уридин в позиции 182 из петли псевдоузла 2 (рис 5Б), связанный с тремя различными нуклеотидами из области второго и третьего псевдоузла. Продукт X4 состоит из комбинации двух продуктов сшивания продукта X5 и одного из продуктов X1-3. К сожалению, нам не удалось определить места сшивок с точностью до нуклеотида, поскольку тмРНК обладает очень компактной структурой, и после ее облучения ультрафиолетовым светом отжиг праймеров затруднен. Тем не менее, данные по фотоаффинному химическому сшиванию, полученные в нашей работе (рис 6), подтверждают существование двух компактно свернутых доменов в молекуле тмРНК.



**Рисунок 5.** Примеры анализа продуктов фотоаффинного химического сшивания. А. Анализ продуктов X2 и X4 (рис. 4) в ПААГ в денатурирующих условиях после разрезания РНК РНКазой H в присутствии олигонуклеотидов. Дорожки 1-3 – без олигонуклеотида. Дорожки 4-6 – в присутствии олигонуклеотида, комплементарного последовательности 200-217 тмРНК. Дорожки 7-9 – в присутствии олигонуклеотидов, комплементарных последовательности 200-217 и 336-363 тмРНК. Дорожки 10-12 – в присутствии олигонуклеотидов, комплементарных последовательности 200-217 и 312-325 тмРНК. Дорожки 13-15 – в присутствии олигонуклеотидов, комплементарных последовательности 200-217 и 274-291 тмРНК. Дорожки 16-18 – в присутствии олигонуклеотидов, комплементарных последовательности 200-217 и 243-260 тмРНК. Дорожки 19-21 – в присутствии олигонуклеотидов, комплементарных последовательности 200-217 и 128-145 тмРНК. Дорожки 22-24 – в присутствии олигонуклеотидов, комплементарных последовательности 200-217 и 56-73 тмРНК. Дорожки 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 – гидролиз контрольного образца (1, рис 4). Дорожки 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 – гидролиз образца X2. Дорожки 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 – гидролиз образца X4. Позиции продуктов фотоаффинного химического сшивания указаны стрелками. Б. Анализ продуктов фотоаффинного химического сшивания методом обратной транскрипции. А,Г,С,У – сиквенс тмРНК. Дорожки X1-X5, анализ соответствующих продуктов фотоаффинного химического сшивания (рис. 4). Позиция сигнала остановки обратной транскрипции в позиции C183, соответствующая сшивке нуклеотида U182, показана стрелкой.



**Рисунок 6.** Двудоменная организация пространственной структуры тмРНК

Согласно нашей модели домены 1 и 2 связаны между собой кодирующей частью и псевдоузлом 4 (рис. 3). Мы предполагаем, что в растворе домены 1 и 2 располагаются близко друг к другу, формируя очень компактную структуру, которая, возможно, стабилизирована взаимодействием с белками (например, белком SmpB, рибосомным белком S1 или фактором элонгации Tu). В такой третичной структуре мРНК-подобная часть тмРНК спрятана между двумя структурно-функциональными доменами 1 и 2 тмРНК (рис. 3А).

Мы предполагаем, что такая компактно свернутая аминокислотированная форма тмРНК входит в А участок рибосомы в комплексе с элонгационным фактором Tu в GTP форме и белком SmpB. Таким образом, этот комплекс может быть похож на канонический комплекс, сформированный aa-тРНК и фактором элонгации Tu. Когда домен 1 тмРНК взаимодействует с А участком рибосомы, в рибосоме происходит конформационное изменение, которое вызывает гидролиз GTP до GDP. Это ведет к конформационным изменениям в EF-Tu и, возможно, также в тмРНК. Аминокислотированный ССА-конец тмРНК перемещается в пептидилтрансферазный центр рибосомы, и элонгационный фактор Tu покидает рибосому. На этой стадии домен 2 должен занять свой участок связывания на рибосоме на внешней стороне 30S субчастицы.

Далее, элонгационный фактор G взаимодействует с рибосомой и способствует прохождению транслокации, после которой тРНК-подобная часть домена 1 тмРНК и структурно-функциональный аналог кодон-антикодонного дуплекса перемещаются в Р участок рибосомы, а первый кодон мРНК-подобной части, кодирующий аланин, входит в А участок рибосомы благодаря раскрытию данной области (рис. 3Б). В то же время домен 2 остается связанным со своим участком на рибосоме. На следующих стадиях домен 1 движется из Р участка рибосомы в Е участок и, возможно, затем выходит из рибосомы. Домен 2 остается связанным со своим участком до терминации трансляции мРНК-подобной части тмРНК. Транслокация кодирующей части тмРНК осуществляется обычным путем. В тот момент, когда стоп-кодон матричной части тмРНК появляется в А участке рибосомы, происходит каноническая терминация трансляции, и тмРНК покидает рибосому после диссоциации последней на субчастицы. Таким образом, в ходе *транс*-трансляции домены 1 и 2 не подвергаются значительным структурным перестройкам, происходит лишь разворачивание мРНК-подобной части и поворот псевдоузла 1 транспортно-матричной РНК (рис. 3Б и 3В).

### **3. Поиск элемента тмРНК, обеспечивающего узнавание А участком рибосомы**

Для осуществления *транс*-трансляции, аминокислотированная тмРНК узнает рибосому, арестованные на мРНК, утративших стоп-кодон. В этом случае в А участке рибосомы невозможно образование классического кодон-антикодонного дуплекса. Как

уже упоминалось выше, мы полагаем, что домен 1 тРНК содержит некий элемент, который структурно мимикрирует кодон-антикодонный дуплекс между тРНК и мРНК, узнающийся А участком рибосомы. Для поиска нуклеотидных остатков, формирующих такой структурный элемент, мы применили метод сайт-направленного мутагенеза.

Первым кандидатом на роль участников „кодона“ были нуклеотиды 87-89GUC, предшествующие кодону, кодирующему первую аминокислоту сигнального пептида.

В роли потенциального „антикодона“ для нуклеотидов 87-89GUC мы рассматривали частично комплементарный к последовательности 87-89GUC триплет нуклеотидов 318-320GAU (имея в виду, что взаимодействие между G и U является достаточно распространенным в мире РНК). Данный триплет располагается в тРНК-подобной части тмРНК рядом с областью, образующей антикодонную петлю в канонической тРНК. Кроме того, по сообщению ряда исследователей именно данная область тРНК-подобной части тмРНК, возможно, взаимодействует с декодирующим центром рибосомы.

Для проведения сайт-направленного мутагенеза на базе вектора рGEM-T мы создали конструкцию рGEM-tmRNA, которая содержала ген *ssrA*, кодирующий тмРНК, под контролем собственного конститутивного промотора и заканчивающийся своим терминатором транскрипции. Этот вектор позволяет экспрессировать ген тмРНК *in vivo*. Все мутантные варианты тмРНК созданы в дальнейшем на базе данной плазмиды.

Для проверки функциональной активности тмРНК мы применили два метода. Первый метод основан на использовании гибридного фага  $\lambda$ immP22, требующего для своего роста присутствия в клетке функционально активных молекул тмРНК. Разница между титром фага, выросшего на клетках, содержащих ген тмРНК, и на штаммах с делецией *ssrA*, составляет примерно 10000 раз, что позволяет достоверно оценить функциональную активность молекул тмРНК. Введение плазмиды рGEM-tmRNA, экспрессирующей тмРНК, в клетки штамма X90 ( $\Delta$ *ssrA*) восстанавливает титр гибридного фага  $\lambda$ immP22 до уровня дикого типа, который существенно отличается от титра фага на штамме с делецией гена *ssrA*.

Другой метод позволяет проводить прямую оценку функциональной активности тмРНК (т.н. „генетическая система“). В клетки штамма с делетированным геном *ssrA* вводили две плазмиды, одна из которых позволяла конститутивно экспрессировать исследуемую тмРНК, а другая содержала модуль, дающий возможность отслеживать функциональную активность тмРНК. Данный модуль состоит из двух генов. Первый ген, находящийся под контролем индуцибельного *lac* промотора и кодирующий укороченный вариант фагового репрессора Arg, непосредственно заканчивается терминатором транскрипции, в котором все стоп-кодоны в открытой рамке считывания удалены. Второй ген дает устойчивость к антибиотику канамицину и находится под

контролем фагового промотора *Pant*. Этот промотор является мишенью для репрессора *Arg*. При добавлении индуктора в среду образуется мРНК фагового репрессора *Arg*, не содержащая стоп-кодона. Рибосомы, транслирующие такую мРНК, будут „арестованы“ на 3'-конце матрицы, и образующийся комплекс является естественной мишенью для тмРНК. В клетках с активной тмРНК *Arg* репрессор будет подвергаться тагированию и деградации под действием клеточных протеаз. Такие клетки будут устойчивы к канамицину. Если в клетках тмРНК отсутствует или функционально неактивна, то не произойдет деградация *Arg* репрессора, и он репрессирует экспрессию гена, дающего устойчивость к канамицину, связавшись с промотором *Pant*. Такие клетки чувствительны к присутствию канамицина.

В табл. 2 суммированы данные о мутациях, введенных нами в последовательность потенциальных „кодона“ (87-89) и „антикодона“ (318-320) для частичного или полного нарушения их гипотетического взаимодействия.

Оказалось, что ни одна из мутаций в данных районах не сказывается ни на аминокислотировании, ни на функциональной активности тмРНК, что было подтверждено как в фаговой системе проверки активности, так и в „генетической системе“.

Следовательно, представляется маловероятным непосредственное участие нуклеотидов 87-89 и 318-320 в формировании структурного элемента, который узнает А участок рибосомы.

Таблица 2 Влияние мутаций в области 87-89 и 318-320 на функциональную активность тмРНК

Мутант	Рост	Аминокислотирование
GAG (87-89)	+++	+++
GAC (87-89)	+++	+++
UAC (87-89)	+++	+++
GAG (318-320)	+++	+++
AAG (318-320)	+++	+++
ACA (318-320)	+++	+++

Интересно отметить, что было высказано предположение о том, что область 85-87, представляющая собой триплет UAR (R-пуриновое основание), возможно, узнается фактором терминации RF1, и данный фактор участвует в позиционировании первого кодона кодирующей части тмРНК в А участке рибосомы. Согласно нашим данным, замена UAG на UAU (мутант 87-89 UAC) не затрагивала функциональную активность тмРНК. Кроме того, участвуя в *транс-трансляции*, данный фактор терминации не должен проявлять свою пептидил-тРНК гидролазную функцию.

Вероятно, в узнавании А участком рибосомы молекулы тмРНК задействованы какие-то более сложные механизмы. Так, согласно литературным данным, петля тмРНК, соответствующая антикодоновой петле канонической тРНК, возможно, взаимодействует с декодирующим центром рибосомы. Для проверки того, насколько этот структурный элемент важен для протекания процесса *транс*-трансляции, мы изменили методом сайт-направленного мутагенеза нуклеотиды, образующие данную петлю, таким образом, чтобы стало возможным формирование спирального участка в этом районе.

Однако, согласно нашему анализу функциональной активности *in vivo* данный мутант имел сходный с тмРНК дикого типа фенотип, и эта мутация не затрагивала функции тмРНК. Это свидетельствует против того, что данная петля выполняет функцию, аналогичную канонической антикодоновой петле тРНК. Возможно, что другие части тмРНК образуют структурный элемент, узнающийся декодирующим центром рибосомы, или данное взаимодействие определяется какими-либо *транс*-факторами.

Согласно полученной недавно кристаллической структуре комплекса белка SmpB и тРНК-подобной части тмРНК и последующему моделированию позиции данного комплекса в А участке рибосомы петля, соответствующая антикодоновой петле канонической тРНК, и белок SmpB находятся в непосредственной близости от декодирующего центра рибосомы. Известно, что белок SmpB абсолютно необходим для *транс*-трансляции, в частности, показана его необходимость для начального связывания тмРНК с А участком рибосомы, а также влияние на аминокислотирование тмРНК как *in vitro*, так и *in vivo*. Таким образом, возможно, что именно белок SmpB играет главную роль в узнавании тмРНК декодирующим центром рибосомы.

#### 4. Исследование роли некоторых консервативных нуклеотидов тмРНК

Методом сайт-специфического мутагенеза мы проверили функциональную важность некоторых высококонсервативных нуклеотидов тмРНК

Первыми проанализированными нуклеотидами были 307-308GU. Ранее в нашей лаборатории при изучении необычного комплекса между элонгационным фактором Tu в GDP форме и деацелированной тмРНК методом обратной транскрипции было показано, что нуклеотид U308 непосредственно участвует в образовании сшивки с элонгационным фактором. Хотя эти результаты не позволяют однозначно заявить о доминирующей роли данного нуклеотида в образовании комплекса, они указывают на важность региона тмРНК, окружающего данный нуклеотид, для взаимодействия с элонгационным фактором Tu в GDP форме. Интересно отметить, что следующий за U308 нуклеотид G307 инвариантен во всех известных на данный момент генах тмРНК (более 150 зубктерий с известной последовательностью генома)

Следующими кандидатами для анализа были высококонсервативные нуклеотиды 85-86UA, отстоящие на один триплет от первого кодона мРНК-подобной части тмРНК и нуклеотиды 300-301UA (консервативность более 95%), комплементарные друг другу. Они, возможно, являются частью структурного элемента, узнаваемого А участком рибосомы.

Данные о мутациях, введенных по описанным выше сайтам, и их влиянии на функционирование тмРНК суммированы в таблице 3. В то время, как мутации нуклеотидов 307-308 вызывают лишь замедление роста клеток в системе проверки активности *in vivo* и, следовательно, незначительно сказываются на функционировании тмРНК, мутации 300-301UA→CC и 85-86UA→CC приводят к гибели клеток, и, таким образом, полностью инактивируют тмРНК. Молекулы тмРНК, мутантные по положениям 85-86, аминокислотилировались *in vitro* с той же эффективностью, что тмРНК дикого типа (выход аминокислотилирования составлял 40%), следовательно, эти мутации затрагивают именно способность тмРНК осуществлять *транс*-трансляцию.

Таблица 3 Влияние мутаций высококонсервативных нуклеотидов на функциональную активность тмРНК Nd- не было определено.

Мутант	Рост	Аминокислотилирование
UC (85-86)	±	+++
CA (85-86)	++	+++
CC (85-86)	-	+++
CC (300-301)	-	Nd
U308C	++	Nd
U307A	+	+++

Из литературных данных известно, что делеции этих нуклеотидов приводят к сдвигу рамки считывания сигнального-пептида, а мутация U85C приводила к снижению выхода тагированного продукта. В экспериментах по "рандомизации" нуклеотидной последовательности области, прилегающей к кодирующей части тмРНК, была продемонстрирована важность нуклеотидов 85-86 для функционирования тмРНК. Можно предположить, что дистальные элементы домена 1 обеспечивают позиционирование области 85-89 и первого кодона GCA, кодирующего аланин, а нуклеотиды UA в позициях 85-86 являются локальными детерминантами такого позиционирования.

## 5. Поиск интрамолекулярных супрессоров для летальных мутаций 85-86СС и

### 300-301СС

Для проверки существования в тмРНК взаимодействия нуклеотидов, мутации которых приводят к летальному фенотипу, между собой или с другими нуклеотидами тмРНК, мы провели поиск супрессоров летального эффекта этих мутаций.

В нашей работе мы использовали клетки *E coli* штамма SL185, несущего мутации в гене *mutD*, для получения случайных мутаций в плаزمидах, содержащих тмРНК с летальными мутациями 85-86СС или 300-301СС. Полученный набор плазмид со случайными мутациями тестировали в системе *in vivo* для отбора только тех тмРНК, которые обладают функциональной активностью. Была определена нуклеотидная последовательность мутантов, обладающих функциональной активностью.

Интересно отметить, что все мутации, восстанавливающие функциональную активность тмРНК с летальной мутацией 300-301СС, являются реверсиями этих нуклеотидов к дикому типу UA (9 вариантов из 9 секвенированных). В случае тмРНК с летальными мутациями в положении 85-86СС во всех вариантах в положении 86 появлялся нуклеотид А (14 из 14), что соответствует дикому типу. Вариантов тмРНК, восстановивших свою функциональную активность, не изменив нуклеотиды в позициях 86 или 300-301, обнаружено не было.

Таким образом, результаты данного эксперимента указывают на важность нуклеотидов 85-86UA и 300-301UA для функциональной активности тмРНК, но интрамолекулярных взаимодействий между этими нуклеотидами обнаружено не было. Не выявлены и другие потенциальные партнеры этих функционально важных нуклеотидов, мутации в которых могли бы компенсировать летальный фенотип.

Ответ на вопрос о роли этих нуклеотидов в *транс*-трансляции, а также многие другие вопросы о функционировании тмРНК может дать изучение структуры комплексов тмРНК с рибосомой методом криоэлектронной микроскопии. Для этого необходимо выделить комплексы тмРНК с рибосомой, соответствующие определенным этапам *транс*-трансляции.

## 6. Разработка метода выделения комплекса транспортно-матричной РНК с

### рибосомой

Мы применили метод аффинной хроматографии для выделения комплексов, взаимодействующих тмРНК с рибосомой. В качестве аффинной группы мы выбрали РНК-аптамер к стрептавидину, эффективность использования которого была убедительно продемонстрирована.

РНК-аптамер к стрептавидину мы вводили в молекулу тмРНК вместо псевдоузла 3. Из литературных данных было известно, что в молекуле тмРНК *E coli* псевдоузлы 2, 3

и 4 взаимозаменяемы. Более того, их замещение одноцепочечными участками не сказывается на аминоацилировании тмРНК и на функциональной активности тмРНК в бесклеточной системе *транс*-трансляции. Кроме того, согласно нашей модели пространственной организации тмРНК в рибосоме псевдоузел 3 находится на внешней стороне комплекса и должен быть доступен для взаимодействия на всех этапах *транс*-трансляции (рис. 3).

Для замещения псевдоузла 3 на РНК-аптамер к стрептавидину на первом этапе с помощью метода ПЦР последовательность нуклеотидов, кодирующих псевдоузел, была удалена. Вместо нее были введены сайты разрезания эндонуклеаз рестрикции, и на втором этапе по этим сайтам была вставлена последовательность, кодирующая РНК-аптамер. Полученный мутант, содержащий РНК-аптамер к стрептавидину, сохраняет свою функциональную активность, как было показано в системе *in vivo*, описанной выше.

Для получения гомогенной популяции комплекса тмРНК-рибосома *транс*-трансляцию необходимо остановить на строго определенной стадии. Для этого в нашей работе мы использовали штамм *Escherichia coli SKZ1*, в котором ген *ssrA*, кодирующий тмРНК, был заменен на ген, кодирующий хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, обеспечивающую устойчивость к хлорамфениколу. Кроме того данный штамм кодирует термочувствительный фактор терминации RF2. В молекуле тмРНК терминация синтеза сигнального пептида происходит на стоп-кодоне UAA, находящегося в положении 11 кодирующей области, его могут узнавать оба фактора терминации. Для эффективного использования термочувствительности RF2 для остановки *транс*-трансляции было необходимо заменить стоп-кодон UAA на UGA, который используется только фактором RF2. Кроме того, из литературных данных известно, что эффективность терминации трансляции зависит не только от природы стоп-кодона и активности фактора терминации, но также и от нуклеотидов, окружающих стоп-кодон. Для терминации трансляции на стоп-кодоне UGA наиболее неблагоприятным является контекст GAC CCA UGA A. Мы создали такой мутантный вариант тмРНК, используя описанную выше конструкцию, в которой псевдоузел 3 был заменен на аптамер к стрептавидину. Полученная тмРНК сохраняла функциональную активность в тесте *in vivo*. Клетки, содержащие данную мутантную тмРНК, росли лишь незначительно медленнее по сравнению с клетками дикого типа, что может быть объяснено снижением эффективности терминации трансляции.

Клетки штамма SKZ1 трансформировали плазмидой, несущей такую мутантную тмРНК, и растили до оптической плотности 0,3 при температуре 37°C в присутствии необходимых антибиотиков. Затем повышали температуру до 42°C. В этих условиях эффективность терминации резко снижалась из-за термочувствительности RF2 и

неблагоприятного контекста вокруг стоп-кодона в тмРНК, что позволяло блокировать комплекс на стадии терминации.

Клетки осаждали центрифугированием, получали S30 экстракт и выделяли фракцию рибосом с помощью ультрацентрифугирования. Фракцию рибосом, содержащих тмРНК, выделяли с помощью аффинной хроматографии на стрептавидин-сефарозе. Элюцию рибосом, содержащих тмРНК, проводили с помощью биотина. Состав комплекса анализировали электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 7).

Перемещение стоп-кодона и окружающего его контекста GAC CCA UGA A по матричной области тмРНК позволяет остановить процесс *транс*-трансляции на более ранних этапах. Для этого мы создали конструкции, несущие стоп-кодон в окружении соответствующего контекста в положениях 4 и 5 мРНК-подобной части тмРНК. Данные плазмиды трансформировали в клетки штамма SKZ1; выделение и очистку комплекса проводили, как описано выше.

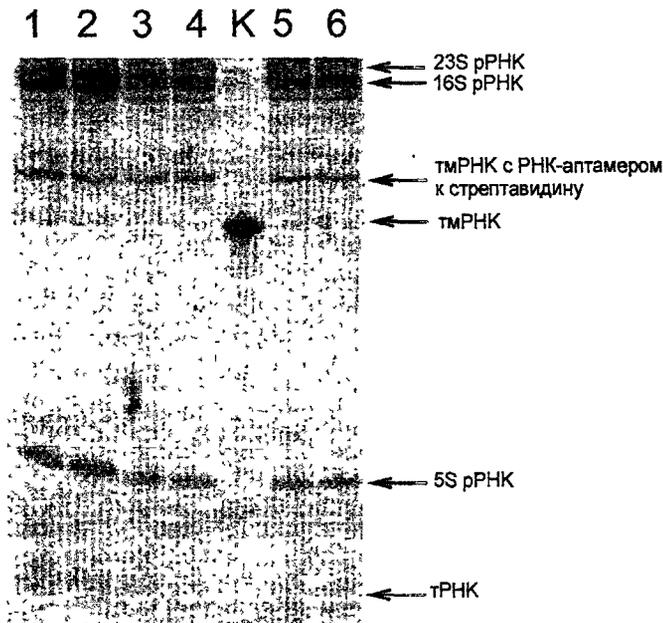


Рисунок 7. Анализ выделенных комплексов с помощью ПААГ в денатурирующих условиях. РНК, выделенная из комплексов с тмРНК, несущей стоп-кодон в положении 4 матричной области до (1) и после (2) диализа, в положении 5 до (3) и после (4) диализа; в положении 11 до (5) и после (6) диализа. К-контроль, тмРНК дикого типа, синтезированная *in vitro*

Как видно из рис. 7, все фракции различных изолированных комплексов тмРНК-рибосома (дорожки 1-6) содержат зоны, соответствующие 23S рРНК, 16S рРНК, 5S рРНК, тРНК и тмРНК с РНК-аптамером к стрептавидину. Подвижность тмРНК с

аптамером к стрептавидину (дорожки 1-6) не совпадает с подвижностью тмРНК дикого типа (дорожка К), что объясняется введением дополнительной последовательности нуклеотидов, кодирующих РНК-аптамер к стрептавидину. Для подтверждения природы РНК в данной полосе использовали дот-блоттинг. Видно, что варианты 4, 5 и 11 выделяются примерно с одинаковой эффективностью. Выход комплекса (согласно денситометрическому анализу) равен примерно 30-35%. Применение диализа для удаления биотина, необходимое для получения образцов, годных для структурного анализа, не сказывалось на стабильности комплексов (дорожки 2, 4, 6).

Таким образом, мы создали систему, позволяющую выделять комплексы тмРНК и рибосомы, соответствующие различным этапам трансляции мРНК-подобной части тмРНК.

С помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях было обнаружено, что во всех комплексах присутствует полоса белка, соответствующая по молекулярной массе белку SmpB.

По предварительным данным, полученные разработанным в этой работе методом комплексы тмРНК с рибосомой, соответствующие различным этапам трансляции мРНК-подобной части тмРНК, оказались пригодными для структурного анализа с помощью криоэлектронной микроскопии.

## ВЫВОДЫ

1. ССА-конец тмРНК не участвует в формировании неканонического комплекса с фактором элонгации Tu•GDP.
2. Результаты фотоаффинного внутримолекулярного сшивания свидетельствуют в пользу существования в молекуле тмРНК двух структурных доменов.
3. Предложена гипотетическая схема взаимодействия тмРНК с рибосомой в процессе *транс*-трансляции.
4. Методом сайт-направленного мутагенеза показана важность нуклеотидов 85-86UA и 300-301UA для функционирования тмРНК.
5. Разработана система селекции *in vivo* функционально активных молекул тмРНК.
6. Получены комплексы тмРНК с рибосомой на разных этапах трансляции мРНК-подобной части тмРНК.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

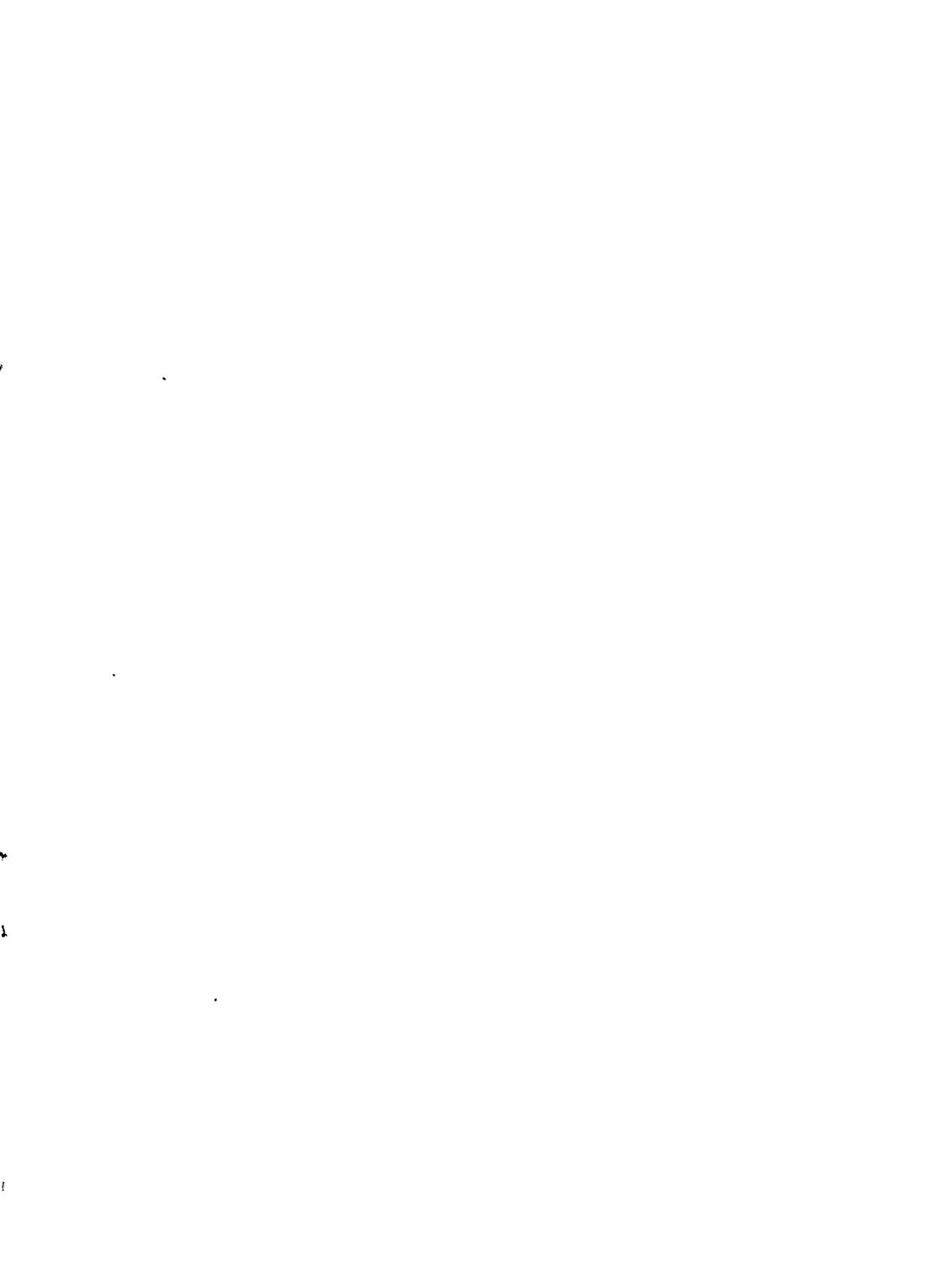
1. Ivanov P.V., Zvereva M.I., Shpanchenko O.V., Dontsova O.A., Bogdanov A.A., Aglyamova G.V., Lim V.I., Teraoka Y., Nierhaus K.H. How does tmRNA move through the ribosome? FEBS Lett. 2002 Mar 6; 514(1):55-59.
2. Zvereva, M.I., Ivanov P.V., Teraoka Y., Topilina N.I., Dontsova O.A., Bogdanov A.A., Kalkum M, Nierhaus K.H., Shpanchenko O.V. Complex of transfer-messenger RNA and elongation factor Tu. Unexpected modes of interaction. J. Biol. Chem. 2001 Dec 14; 276(50): 47702-47708.
3. Wilson D.N., Blaha G., Connell S.R., Ivanov P.V., Jenke H., Stelzl U., Teraoka Y., Nierhaus K.H. Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. Curr. Protein Pept. Sci. 2002 Feb; 3(1):1-53.
4. Zvereva M. I., Ivanov P. V., Topilina N. I., Dontsova O.A., Nierhaus K. H., Shpanchenko O.V. International conference: Trends in nucleic acid chemistry. November, 21-24, 2000, Moscow, Russia, p.40.
5. Zvereva M. I., Ivanov P. V., Teraoka Y., Topilina N. I., Dontsova O. A., Bogdanov A. A., Kalkum M., Nierhaus K. H. and Shpanchenko O. V. Complex of tmRNA and EF-Tu: unexpected mode of interaction. International Conference in honor of Alexander Spirin: Protein Synthesis. August 27- September 1, 2001, Pushchino, Russia, p.68
6. Dontsova O. A., Sergiev P. V., Avdeeva O. N., Shpanchenko O. V., Zvereva M. I., Ivanov P. V., Topilina N. I., Aglyamova G., Bogdanov A. A., Kalkum M., Teraoka Y., Nierhaus K. H. and Brimacombe R.. Interaction of RNP with the *E. coli* Ribosome. International

Conference in honour of Alexander Spirin: Protein Synthesis. August 27- September 1, 2001, Pushchino, Russia, p. 12.

7. Ivanov P. V., Shpanchenko O. V., Dontsova O. A., Bogdanov A. A., Teraoka Y., Nierhaus K. H.. Mutational analysis of some conservative regions in tmRNA. International conference: The dynamics of Ribosome structure and Function. Queenstown, New Zealand, 27<sup>th</sup> January –1<sup>st</sup> February, 2002, p.147.
8. Ivanov P.V., Zvereva M.I., Teraoka Y., Topilina N.I., Dontsova O.A., Bogdanov A.A., Kalkum M., Nierhaus K.H., Shpanchenko O.V. Complex of transfer-messenger RNA and elongation factor Tu. Unexpected modes of interaction. International conference: The dynamics of Ribosome Structure and Function. Queenstown, New Zealand, 27<sup>th</sup> January –1<sup>st</sup> February, 2002, p. 153.
9. Ivanov P.V., Zvereva M.I., Shpanchenko O.V., Bogdanov A.A., Nierhaus K.H., Dontsova O.A. How does tmRNA move through the ribosome? RNA Conference 2003, Vienna, 1<sup>st</sup> July- 7<sup>th</sup> July 2003, p.700.
10. Shpanchenko O.V., Zvereva M.I., Ivanov P.V., Topilina N.I., Nierhaus K.H., Isaksson L.A., Bogdanov A.A., and Dontsova O.A. Model of tmRNA pathway through the ribosome. 6<sup>th</sup> International Conference on Ribosome Synthesis 2003, Arcachon, France, June 6-10, 2003, p.64.
11. Shpanchenko O. V., Zvereva M. I., Ivanov P. V., Topilina N. I., Nierhaus K. H., Dontsova Q. A. and Bogdanov A.A.. Complex of tmRNA and EF-Tu: unexpected mode of interaction. 5<sup>th</sup> International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids. April 8<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> 2001, Sheffield, England, p.58.







№ 21290

2003-A

---

21290