

На правах рукописи

КОСТАРЕВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**СТРУКТУРНЫЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ОБРАЗОВАНИЯ И РАСПАДА КОМПЛЕКСОВ РИБОСОМНОГО
БЕЛКА L1 С РНК**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Институте белка РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Гарбер Мария Борисовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Демидкина Татьяна Викторовна

доктор биологических наук

Калинина Наталья Олеговна

Ведущая организация:


Филиал Института биоорганической
химии им. Академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова

Защита состоится «29» октября 2010 года в ___ часов на заседании совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ауд.536.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Определение принципов специфического взаимодействия макромолекул - одна из важнейших задач молекулярной биологии. В функциональном РНК-белковом комплексе взаимодействия между белком и РНК всегда специфичны, что делает каждый такой комплекс уникальным. Удобным объектом для выявления структурных особенностей, определяющих максимально возможную специфичность РНК-белковых взаимодействий, является рибосома, в процессе сборки которой каждый белок занимает строго определенное место на поверхности рибосомных РНК. Специфические РНК-белковые взаимодействия играют важную роль в функционировании живой клетки и определяют течение многих жизненно важных процессов. Специфичность связывания двух макромолекул выражается в их способности образовывать друг с другом стабильный функционирующий комплекс. Примером таких специфических комплексов являются комплексы регуляторных рибосомных белков с рибосомными и матричными РНК. Мерой специфичности обычно считают сродство молекул друг к другу, которое определяется величиной кажущейся равновесной константы диссоциации их комплекса. Эти величины, измеренные для различных РНК-белковых комплексов, могут отличаться на несколько порядков. Во многих случаях только функциональная значимость комплекса является тем критерием, который позволяет считать этот комплекс специфическим. Проблема специфичности приобретает особое значение при разработке лекарственных препаратов.

Рибосомные РНК-белковые комплексы характеризуются изменяющимся в широких пределах сродством белков к соответствующим участкам рРНК, и, тем не менее, в каждом из них взаимодействие всегда специфично. В рамках данной диссертационной работы проведены структурно-кинетические исследования РНК-белковых комплексов рибосомного белка L1 с целью выявления индивидуальных особенностей структуры белка и РНК, ответственных за формирование и стабильность специфических РНК-белковых комплексов. Белок L1 образует подвижный боковой выступ рибосомы, участвующий в высвобождении деацилированной тРНК из E-сайта. Кроме того, этот белок имеет специфический участок связывания на матричной РНК и осуществляет регуляцию собственного синтеза по принципу «обратной связи». Ранее в нашей лаборатории были определены пространственные структуры белка L1 в свободном состоянии и в комплексе со специфическими фрагментами мРНК и рРНК. Проведенные в данной диссертационной работе комбинированные структурно-кинетические исследования таких комплексов, а также комплексов, образованных мутантными формами белка L1 с фрагментами рРНК и мРНК, вносят существенный вклад в понимание принципов РНК-белкового узнавания.

Цель работы: выяснение структурных основ специфического РНК-белкового взаимодействия на примере рибосомного белка L1.

Основные задачи работы:

- получение мутантных форм белка L1 с измененным сродством к мРНК и рРНК,
- кристаллизация мутантных форм белка L1 в изолированном состоянии и в комплексе с РНК,
- получение биотинилированных специфических фрагментов мРНК и рРНК, взаимодействующих с белком L1 для их использования в кинетических исследованиях,

- кинетический анализ взаимодействия рибосомного белка L1 и его мутантных форм со специфическими фрагментами рРНК и мРНК.

Научная новизна и практическая ценность работы. Получены мутантные формы двухдоменного рибосомного белка L1 с точечными заменами аминокислотных остатков в области консервативного РНК-связывающего модуля, междоменной перетяжки; получен также изолированный домен I белка L1, содержащий РНК-связывающий модуль. Выращены пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы четырёх мутантных форм белка L1, а также кристаллы комплекса домена I белка L1 со специфическим фрагментом мРНК. Анализ определенных пространственных структур изолированного домена I и его комплекса показал, что взаимодействие изолированного домена I с мРНК идентично взаимодействию полноразмерного белка L1 с тем же фрагментом мРНК.

Впервые проведён структурно-кинетический анализ взаимодействия рибосомных белков L1 из бактерии *Thermus thermophilus* и археи *Methanococcus jannaschii* и их мутантных форм со специфическими фрагментами мРНК и рРНК. Мы использовали метод поверхностного плазмонного резонанса, который позволяет наблюдать за взаимодействием молекул в реальном времени. Было показано, что изолированный домен I рибосомного белка L1 формирует практически такие же стабильные комплексы со специфическими фрагментами мРНК и рРНК, как и полноразмерный белок, однако отсутствие второго домена увеличивает скорость формирования комплексов. Также было показано, что образование на поверхности РНК-связывающего модуля в мутантных формах белка L1 выступов величиной 1-2 Å приводит к нарушению комплементарности контактирующих поверхностей и к значительной дестабилизации комплексов. Тем не менее, специфичность РНК-белкового взаимодействия при этом сохраняется. Мутации в области междоменной перетяжки белка L1 привели к изменению взаиморасположения доменов белка и небольшому ослаблению РНК-связывающих свойств белка.

Полученные результаты имеют фундаментальный характер. Методические разработки по выделению РНК и белков, введению точечных замен в участки аминокислотной последовательности белка, кинетическим исследованиям РНК-белковых комплексов и их кристаллизации 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 48 рисунков и 9 таблиц. Общий объём диссертации 102 страницы. Библиография включает 69 названий.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи. Результаты диссертации докладывались на международных и Российских конференциях.

Обзор литературы посвящен описанию метода поверхностного плазмонного резонанса. В нем обсуждаются принцип метода, методические вопросы, а также примеры применения данного метода для исследования межмолекулярных взаимодействий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение специфических фрагментов мРНК и рРНК

Фрагменты РНК, которые используются для кинетических экспериментов и иммобилизованы на поверхности оптических биосенсоров, должны быть достаточной длины, чтобы принять конформацию, необходимую для взаимодействия с белком, но не должны быть слишком длинными, чтобы меньше подвергаться действию рибонуклеаз.

Для кинетических экспериментов мы использовали специфический фрагмент мРНК для белка L1 из *M. jannaschii* длиной 48 нуклеотидов с добавленными 18 неспаренными нуклеотидами на 3'-конце, всего - 66 н.о. (Tishchenko *et al.*, 2008). При использовании фермента РНК-лигазы наличие неспаренных нуклеотидов на 3'-конце увеличивает эффективность лигирования фрагментов РНК с биотинилированным РНК-олигонуклеотидом.

Для получения фрагмента рРНК для кинетических исследований в вектор рUC18 был клонирован ген специфического фрагмента 23S рРНК из *M. vannielii* длиной 79 нуклеотидов (рис. 1). Он включает участок 23S рРНК, содержащий спирали 76, 77 и небольшую часть спирали 78 (рис. 1а). Вырезанный участок спирали 78 заменялся петлей из 4 нуклеотидов UUCG. Предположительно, наличие-длинной спирали 76 способствует правильному сворачиванию молекулы РНК на сенсорном чипе, что обеспечивает взаимодействие РНК с белком. Для прикрепления к сенсорному чипу к данному фрагменту рРНК при рестрикции плазмиды были добавлены ещё 18 неспаренных нуклеотидов на 3'-конец (всего-97 н.о.).

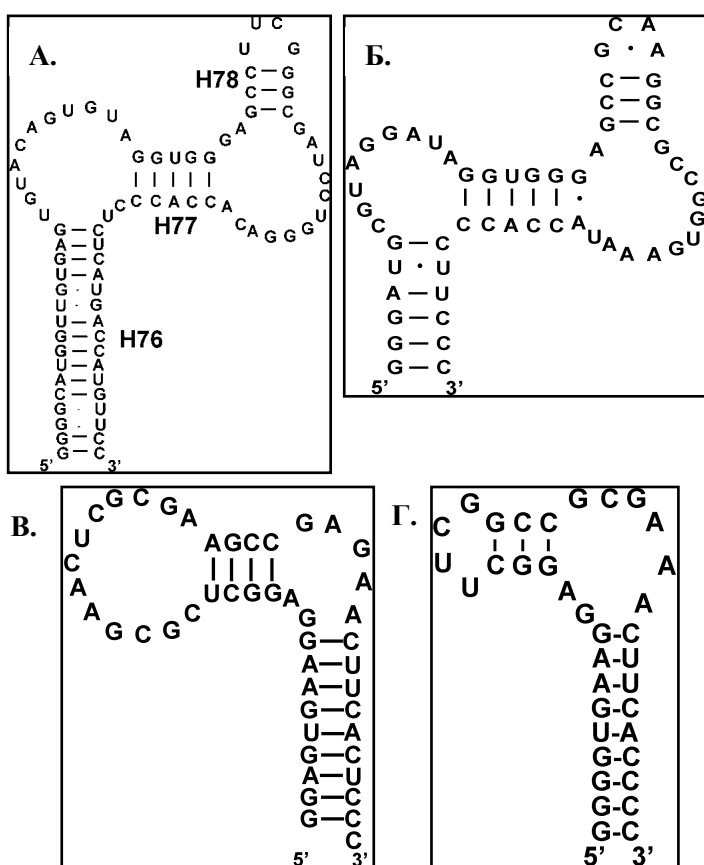


Рис. 1: Специфические фрагменты рРНК и мРНК, связывающиеся с белком L1, использованные нами в данной работе.

А. Фрагмент 23S рРНК из *M. vannielii* длиной 79 н.о.;

Б. минимальный фрагмент 23S рРНК из *T. thermophilus* длиной 55 н.о.;

В. участок связывания белка L1 с мРНК из *M. jannaschii* длиной 48 н.о.;

Г. минимальный фрагмент мРНК из *M. vannielii* длиной 36 н. о.

Для исследования взаимодействия с РНК белка L1 и его первого домена методом электрофореза в неденатурирующих условиях использовались минимальные фрагменты рРНК длиной 55 н.о. и мРНК длиной 36 н.о.

Все фрагменты РНК были получены транскрипцией *in vitro* с использованием T7 РНК-полимеразы с линейризованных плазмид рUC18, содержащих гены специфических фрагментов мРНК и рРНК. Эффективность синтеза РНК T7 РНК-полимеразой в значительной степени 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. Фрагмент РНК очищали от побочных продуктов реакции, а также от компонентов транскрипционной смеси методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Чистота полученных фрагментов была пригодной для кинетических экспериментов и кристаллизации (рис. 2).

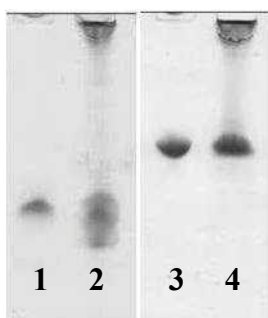


Рис. 2: Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях:

1. очищенный фрагмент мРНК длиной 66 н.о.;
2. транскрипционная смесь фрагмента мРНК длиной 66 н.о.;
3. очищенный фрагмент рРНК длиной 97 н.о.;
4. транскрипционная смесь фрагмента рРНК длиной 97 н.о.

В нашей работе мы использовали сенсорные чипы с иммобилизованным авидином (NLS, фирма Bio-Rad). Для введения биотина в РНК был выбран метод присоединения биотинилированного РНК олигонуклеотида к гидроксилу на 3'-конце фрагмента РНК с помощью РНК лигазы. Нуклеотидная последовательность олигонуклеотида следующая: 5'-P-GCGCAGCGAG-биотин 3'. Специфические фрагменты мРНК и рРНК, которые были модифицированы биотином, очищали с помощью препаративного электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Для проверки эффективности биотинилирования фрагментов РНК их смешивали со стрептавидином в эквимольных количествах и анализировали данную смесь методом электрофореза в неденатурирующих условиях (рис. 3).

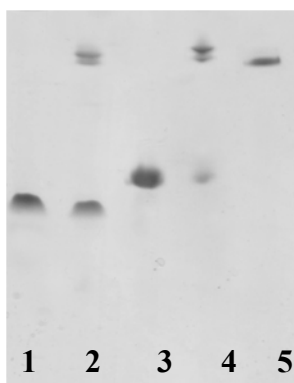


Рис. 3: Электрофоретический анализ комплексов стрептавидина с биотинилированными фрагментами РНК в неденатурирующих условиях:

1. фрагмент мРНК длиной 66 н.о.;
2. биотинилированный фрагмент мРНК длиной 66 н.о. + стрептавидин;
3. фрагмент рРНК длиной 97 н.о.;
4. биотинилированный фрагмент рРНК длиной 97 н.о. + стрептавидин;
5. биотинилированный олигонуклеотид + стрептавидин.

2. Получение и характеристика РНК-связывающих свойств изолированного домена I рибосомного белка L1 из *T. thermophilus*

Рибосомный белок L1 является первичным РНК-связывающим белком, который связывается предпочтительно со специфическим участком на 23S рРНК, но при избытке белка может связываться с регуляторным участком на мРНК и таким образом ингибировать трансляцию собственного оперона. Сродство белка L1 к рРНК намного выше, чем к мРНК, что является необходимым условием для регуляции по типу обратной связи, основанной на прямой конкуренции между двумя участками связывания.

Ранее в нашей лаборатории были определены кристаллические структуры изолированного белка L1 из бактерии *T. thermophilus* и архей рода *Methanococcus*. Анализ этих структур позволил выделить на поверхностях белка и РНК участки, предположительно ответственные за РНК-белковое узнавание. Несколько позднее в нашей лаборатории были определены также структуры комплексов белка L1 со специфическим фрагментом 23S рРНК и со специфическими фрагментами мРНК (Nikulin *et al.*, 2003; Nevskaya *et al.*, 2005, 2006; Tishchenko *et al.*, 2008). Белок L1 состоит из двух доменов, причем его N- и C-концы локализованы в домене I (рис. 4). Центральная часть полипептидной цепи формирует домен II. Два домена соединены перетяжкой, которая состоит из двух противоположно направленных полипептидных цепей.

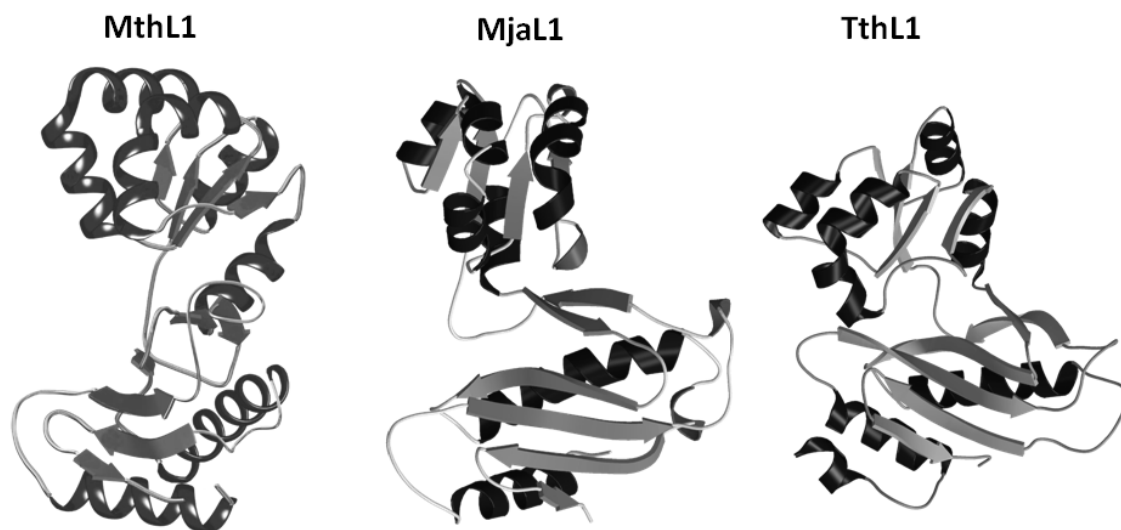


Рис. 4: Модели кристаллических структур белков L1 из различных организмов.

В структуре изолированного белка L1 из бактерии *T. thermophilus* (TthL1) домены сближены (закрытая конформация). В структуре белка L1 из архей *M. jannaschii* (MjaL1) и *M. thermolithotrophicus* (MthL1) домены разнесены друг относительно друга (открытая конформация) (рис. 4). В последнем случае РНК-связывающие участки белка L1 становятся доступны для взаимодействия с РНК, и молекулы способны образовать специфический комплекс. Закрытая конформация белка L1 наблюдается только в кристаллической структуре TthL1 в свободном состоянии (Nikonov *et al.*, 1996); в комплексе с РНК белок принимает открытую конформацию; для белков MjaL1 (Nevskaya *et al.*, 2000) и MthL1 (Nevskaya *et al.*, 2002) характерна открытая конформация во всех состояниях.

Анализ структур комплексов L1-РНК показал, что число аминокислотных остатков, которые контактируют с РНК, в домене II несравненно меньше, чем в

домене I, особенно в комплексе со специфическим фрагментом мРНК. Домен II белка MjaL1 образует с мРНК несколько водородных связей (Nevskaya *et al.*, 2005), а в комплексе TthL1 с фрагментом мРНК длиной 36 нуклеотидов с РНК взаимодействует только домен I (Tishchenko *et al.*, 2006).

Детальный анализ L1-РНК интерфейса показал, что консервативный участок на поверхности домена I (РНК-связывающий модуль) взаимодействует со структурным мотивом, который инвариантен в специфических фрагментах рибосомной и матричной РНК, образуя недоступные для растворителя консервативные водородные связи. Мы предположили, что домен I необходим и достаточен для связывания белка L1 с РНК. Домен II, по-видимому, требуется для обеспечения более высокого сродства белка к специфическому участку на 23S рРНК, который содержит дополнительную петлю. Для проверки данного предположения было решено получить изолированный домен I рибосомного белка TthL1 и исследовать его РНК-связывающие свойства.

2.1. Выделение и очистка рибосомного белка L1 и домена I белка L1 из *T. thermophilus*

Гены рибосомного белка L1 из *T. thermophilus* и его домена I (IdTthL1) экспрессировали в системе Штудиера (Studier *et al.*, 1990). Клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3) были трансформированы плазмидами pET11a-PL, несущими гены белка TthL1 или IdTthL1. Клетки штаммов-суперпродуцентов растили при 37°C при интенсивном перемешивании на богатой среде LB, до оптической плотности $OD_{590}=0.5$ ОЕ. Для активации T7 РНК-полимеразы в среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.5 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 термолабильных белков и хроматографическое разделение белков. Использование такой методики позволяет получить препарат белка с чистотой, пригодной для кристаллизации (рис. 5).

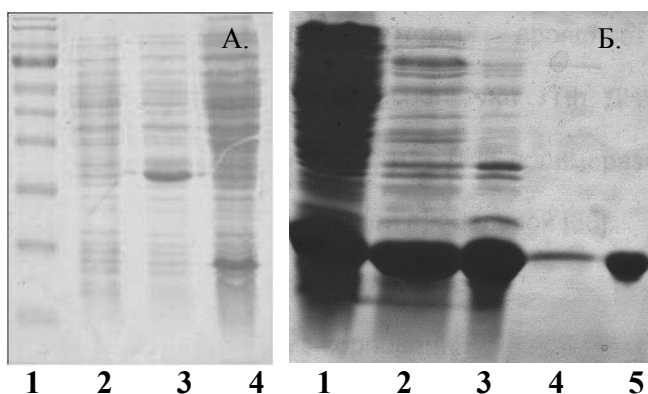


Рис. 5: Электрофореграммы, показывающие уровень продукции TthL1 и IdTthL1 (А) и стадии очистки IdTthL1 (Б).

А. 1. маркеры молекулярного веса;
2. лизат клеток *E. coli* BL21(DE3)/pET11a-PL TthL1 до индукции ИПТГ; 3. лизат клеток *E. coli* BL21(DE3)/pET11a-PL TthL1 через 3 часа после индукции ИПТГ; 4. лизат клеток *E. coli* BL21(DE3)/pET11a-PL IdTthL1 через 3 часа после индукции ИПТГ.

Б. 1. супернатант после удаления дебриса;
2. супернатант после удаления рибосом;
3. супернатант после прогрева и центрифугирования; 4. осадок после прогрева и центрифугирования;
5. препарат IdTthL1 после очистки на CM-Sepharose.

2.2. Кристаллизация IdTthL1

Кристаллизация велась методом диффузии паров в висящей капле при температуре 6°C. Смешивали 2 мкл препарата IdTthL1 с концентрацией 20 мг/мл в буфере, содержащем 60 mM KCl, 30mM Tris-HCl (pH_{25°C} 7.5), с 2 мкл раствора №22 из набора Crystal Screen (Hampton Research) и уравнивали против того же раствора. Кристаллы появлялись в течение 2-3 дней и росли до максимального размера в течение недели. Пространственная структура белка была определена совместно с группой структурных исследований рибосомных белков ИБ РАН.

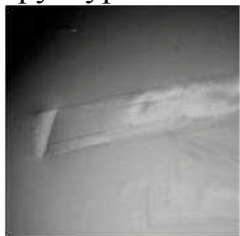


Рис. 6: Кристалл IdTthL1.

Анализ кристаллической структуры IdTthL1 с разрешением 2.3 Å показал, что пространственная укладка цепи в изолированном домене почти полностью совпадает с его структурой в целом белке. Небольшие изменения наблюдаются лишь в области подвижных петель в районах кристаллических контактов. Конформация цепи в области РНК-узнающего модуля практически полностью совпадает с конформацией этого участка в целом белке.

2.3. Исследование взаимодействия IdTthL1 со специфическими фрагментами мРНК и рРНК

РНК-связывающие свойства IdTthL1 исследовались методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях. Было показано, что IdTthL1 образует стабильные комплексы со специфическими фрагментами мРНК и рРНК (рис.7).

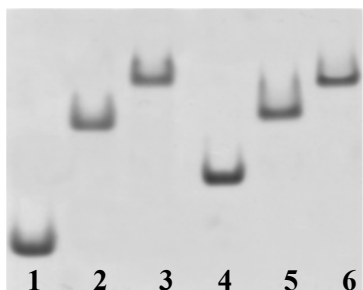


Рис. 7: Электрофоретический анализ взаимодействия TthL1 и IdTthL1 с РНК в неденатурирующих условиях:
1. фрагмент мРНК 36 н.о.; 2. комплекс IdTthL1-мРНК;
3. комплекс TthL1-мРНК; 4. фрагмент рРНК 55 н.о.;
5. комплекс IdTthL1-рРНК; 6. комплекс TthL1-рРНК.

Для сравнения РНК-связывающих свойств IdTthL1 со свойствами целого белка, препарат фрагмента РНК смешивался с препаратом IdTthL1, затем в такую смесь добавляли полноразмерный белок L1 и исследовали состав смеси (рис.8).

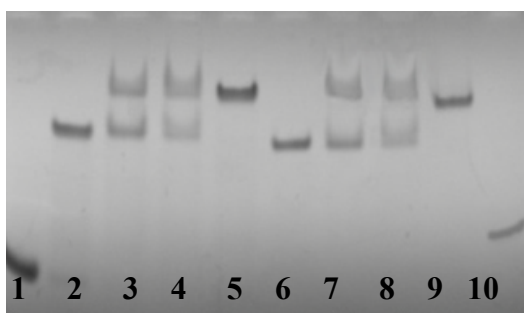


Рис.8: Электрофоретический анализ взаимодействия TthL1 и IdTthL1 с РНК в неденатурирующих условиях:
1. фрагмент мРНК 36 н.о.; 2. комплекс IdTthL1-мРНК; 3. комплекс IdTthL1-мРНК + TthL1 (1:1:1.5); 4. комплекс IdTthL1-мРНК + TthL1 (1:1:3); 5. комплекс TthL1-мРНК; 6. комплекс IdTthL1-рРНК; 7. комплекс IdTthL1-рРНК + TthL1 (1:1:1.5); 8. комплекс IdTthL1-рРНК + TthL1 (1:1:3); 9. комплекс TthL1-рРНК; 10. фрагмент рРНК 55 н.о.

Избыток TthL1 по отношению к IdTthL1 в инкубационной смеси не приводил к преимущественному образованию комплекса РНК с целым белком. Таким образом, было показано, что изолированный домен I имеет практически такое же сродство к специфическим фрагментам мРНК и рРНК, как и полноразмерный белок.

Для проверки того, что взаимодействие с РНК изолированного домена I происходит, так же как и взаимодействие полноразмерного белка, были получены кристаллы комплекса IdTthL1 со специфическим фрагментом мРНК длиной 48 н.о.

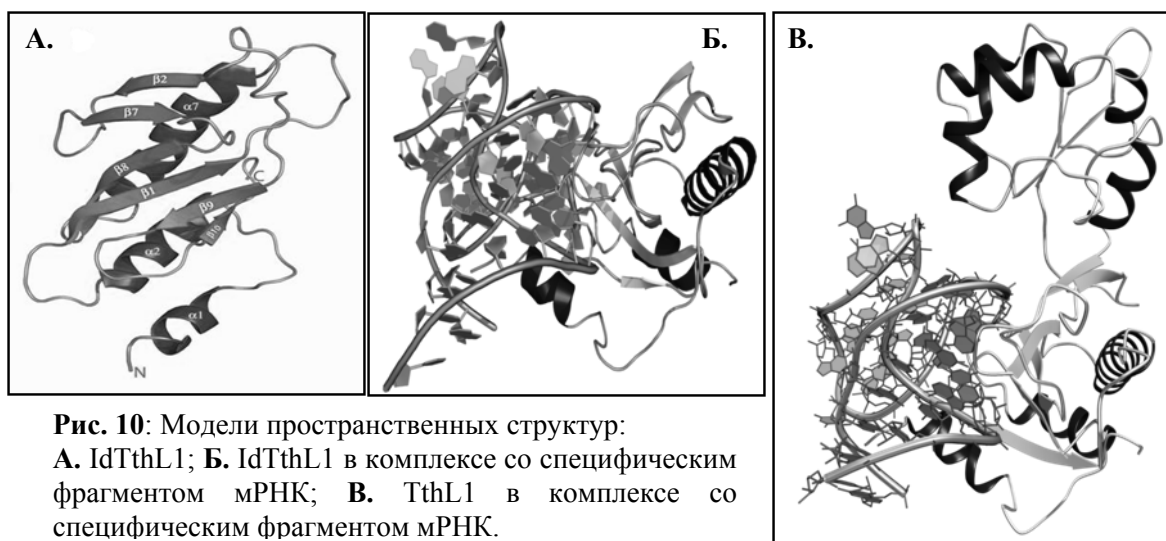
2.4. Кристаллизация IdTthL1 в комплексе со специфическим фрагментом мРНК

Кристаллизация велась методом диффузии паров в висящей капле при температуре 4°C. Ренатурацию мРНК проводили при 60°C в течение 10 минут в 1мМ Na-цитратном буфере (рН 6.4) с последующим охлаждением до 0°C. Фрагмент мРНК и белок IdTthL1 (в буфере, содержащем 60мМ KCl, 30мМ Tris-HCl (рН_{25°C} 7.5) и 2мМ MgCl₂) смешивались в эквимольных количествах. Комплекс смешивали с раствором №6 из набора Natrix (Hampton Research) в соотношении 2.5:0.5 и уравнивали против того же раствора. Кристаллы появлялись в течение недели.



Рис. 9. Кристаллы комплекса IdTthL1 со специфическим фрагментом мРНК.

Структура комплекса IdTthL1 с фрагментом мРНК (рис. 10б) была определена методом молекулярного замещения с разрешением 2.3 Å совместно с группой структурных исследований рибосомных белков. Показано, что область РНК-белкового интерфейса в комплексе IdTthL1 с мРНК не отличается от интерфейса в комплексе TthL1 с мРНК. Таким образом, мы подтвердили, что связывание изолированного домена I белка L1 с мРНК происходит так же, как в составе целого белка.



2.5. Проверка способности изолированного домена I белка L1 регулировать синтез белка L1

Известно, что рибосомный белок L1 регулирует синтез своего оперона по принципу «обратной связи». Схемы организации L11-оперона *E. coli* и L1-оперона *M. vanielii* представлены на рисунке 11.

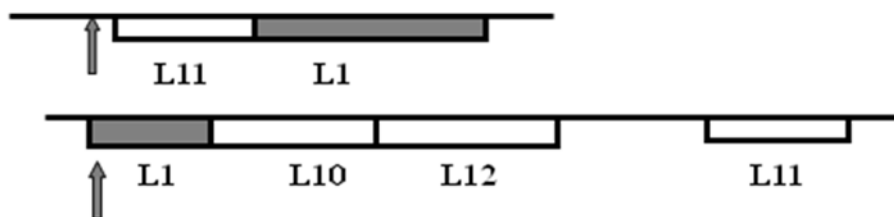


Рис. 11. Схемы организации L11-оперона *E. coli* (вверху) и L1-оперона *M. vanielii* (внизу). Стрелками отмечены участки связывания белка L1 на мРНК.

При наличии в клетке свободной 23S рРНК белок L1 участвует в сборке рибосомы, если в клетке имеется избыток белка L1, он связывается с участком на мРНК и блокирует собственный синтез и синтез белков, гены которых находятся в том же опероне. После появления в клетке свободной 23S рРНК белок покидает мРНК и участвует в сборке рибосомы. Основой для такой регуляции в случае белка L1 является разница сродства белка к мРНК и рРНК (комплексы белка с рРНК намного стабильнее комплексов с мРНК).

Белок L1 взаимодействует с мРНК только аминокислотными остатками домена I, во взаимодействие с рРНК вовлечены оба домена белка. Мы предполагали, что именно это является причиной разного сродства белка к рРНК и мРНК. Тем не менее, методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях было показано, что IdTthL1 успешно конкурирует с полноразмерным белком за связывание со специфическим фрагментом рРНК. Мы решили проверить, способен ли изолированный домен I регулировать синтез белка L1. Для этого мы использовали систему сопряженной транскрипции-трансляции *in vitro* от фирмы Roche.

Данная система включает S30 экстракт из *E. coli* (содержит T7 РНК-полимеразу), реакционную смесь, смесь аминокислот (кроме метионина) и «холодный» метионин. С использованием данной системы мы экспрессировали ген белка L1 из *M. vanielii* (MvaL1) с плазмиды. Участок связывания белка L1 на мРНК из *M. vanielii* расположен в структурной части гена (рис. 11). Добавляя в смесь различные количества изолированных белков TthL1 или IdTthL1, мы наблюдали, как присутствие белка L1 или его первого домена влияет на уровень синтеза белка MvaL1.

Было показано, что наличие в инкубационной смеси как TthL1, так и IdTthL1 значительно ингибирует синтез MvaL1. В качестве отрицательного контроля на мРНК мы использовали плазмиду, содержащую ген рибосомного белка L4 из *T. thermophilus* (TthL4), в качестве отрицательного контроля на белок использовали бычий сывороточный альбумин. Показано, что ингибирование синтеза MvaL1 является специфическим, поскольку оно регулируется только добавлением TthL1 или IdTthL1.

Для того чтобы исследовать, будут ли специфические фрагменты мРНК и рРНК конкурировать между собой за связывание с белком L1, мы добавляли в инкубационную смесь, помимо TthL1 или IdTthL1, фрагмент 23S рРНК, специфически связывающийся с белком L1, и наблюдали, восстанавливается ли синтез MvaL1. В качестве отрицательного контроля добавлялся фрагмент 23S рРНК, специфически связывающийся с белком TthL4 (рис. 12).

Было показано, что в системе трансляции *in vitro* специфический фрагмент 23S рРНК конкурирует с мРНК за связывание с белком. Таким образом, наши эксперименты позволяют предположить, что изолированный домен I белка TthL1 способен регулировать синтез белков L1-оперона археи *M. vannielii*.

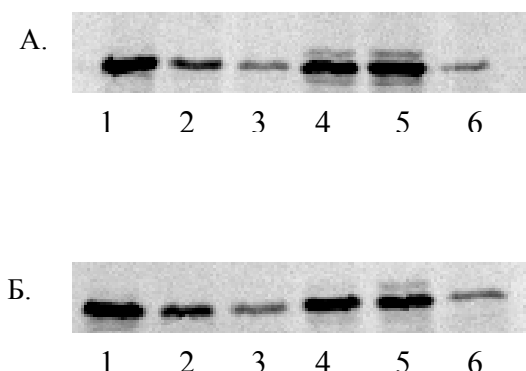


Рис. 12: Авторадиограммы белка MvaL1, синтезированного в присутствии L-[³⁵S]метионина и различных количеств TthL1 (А) или IdTthL1 (Б), и фрагментов 23S рРНК, специфических для связывания с белком L1 (pRNKL1) или белком L4 (pRNKL4).

А: 1. TthL1 0 пМ, 2. TthL1 50пМ, 3. TthL1 100пМ, 4. TthL1 100пМ + pRNKL1 100пМ, 5. TthL1 100пМ + pRNKL1 200пМ, 6. TthL1 100пМ + pRNKL4 100пМ.

Б: 1. IdTthL1 0 пМ, 2. IdTthL1 50пМ, 3. IdTthL1 100пМ, 4. IdTthL1 100пМ + pRNKL1 100пМ, 5. IdTthL1 100пМ + pRNKL1 200пМ, 6. IdTthL1 100пМ + pRNKL4 100пМ.

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

В качестве модельных белков для изучения влияния точечных замен аминокислотных остатков на РНК-связывающие свойства белка L1 мы использовали белки из термофильных организмов – бактериальный TthL1 и архейный MjaL1. Эти белки имеют сходные структуры и функционально взаимозаменяемы в рибосоме (Gourse *et al.*, 1981; Baier *et al.*, 1990). Основные их различия связаны с присутствием дополнительных α -спиралей (в первом домене - для бактериального белка L1 и во втором домене - для архейного белка L1) и с различным взаиморасположением доменов белка в свободном состоянии.

В данной работе основное внимание уделено исследованию влияния двух факторов на РНК-связывающие свойства белка L1: конформационных изменений при переходе белка из свободного в РНК-связанное состояние и искусственных изменений рельефа РНК-белкового интерфейса.

3.1. Влияние конформации белка в свободном состоянии на его РНК-связывающие свойства

3.1.1. Мутантные формы белка L1 с точечными заменами в междоменной перетяжке

Анализ кристаллических структур TthL1 в свободном и связанном с РНК состояниях выявил два типа конформационных изменений, которые должны произойти в белке до момента образования комплекса. Первое из них связано с изменением взаимного расположения доменов и переходом белка из закрытой конформации в открытую; второе – с изменением положения боковой цепи глутамата в положении 42, входящего в состав РНК-связывающего модуля на домене I белка L1.

Мы предполагаем, что во взаимодействие с РНК вступают лишь те молекулы белка, которые имеют конформацию РНК-связывающего модуля, полностью соответствующую конформации в комплексе белка с РНК. Если конформации данного участка в свободном и РНК-связанном состояниях различны, то в свободном состоянии молекулы, способные и неспособные связываться с РНК, находятся в

динамическом равновесии. В растворе доля молекул, способных образовать РНК-белковый комплекс, оказывается ниже общей концентрации белка, что может выражаться в уменьшении константы скорости ассоциации. В рамках данной работы мы исследовали влияние конформационных изменений на РНК-связывающие свойства белков TthL1 и MjaL1.

Как было сказано выше, положение доменов в свободных бактериальном (TthL1) и архейных (MjaL1 и MthL1) белках различно и соответствует закрытой и открытой конформациям (рис. 13). Из анализа структур РНК-белковых комплексов мы знаем, что как архейный, так и бактериальный L1 может связаться с РНК только в открытой конформации. Ранее методом связывания на нитроцеллюлозных фильтрах было показано, что сродство MjaL1 к РНК значительно выше, чем сродство TthL1 (Köhler *et al.*, 1998). Мы предположили, что наличие закрытой конформации TthL1 в свободном состоянии замедляет его взаимодействие с РНК. Анализ структуры бактериального и архейных белков и их аминокислотных последовательностей позволил предположить, что за закрытую конформацию белка TthL1 может отвечать остаток аланина в 158 положении, который отсутствует в архейных белках. Этот остаток расположен в междоменной перетяжке белка.

Была получена генетическая конструкция и выделен белок TthL1 с делецией аланина в 158 положении (TthL1 Δ Ala158), а также клонирован ген белка MjaL1 с дополнительным аланином между лизинами в 146 и 147 положении (MjaL1+Ala147) и мутантный белок также выделен. Мы предполагали, что отсутствие аланина приведёт к тому, что TthL1 Δ Ala158 будет неспособен находиться в закрытой конформации, а MjaL1+Ala147, напротив, примет закрытую конформацию.

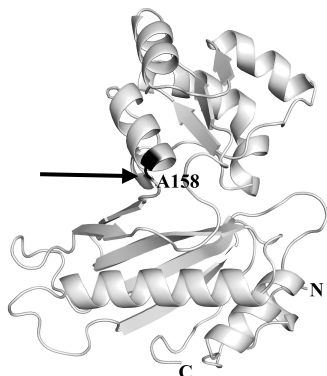


Рис. 13: Модель пространственной структуры TthL1 (Nikonov *et al.*, 1996). Положение аланина 158 указано стрелкой.

Полученные мутантные формы белка были закристаллизованы. Условия кристаллизации были следующие.

Кристаллизация белка TthL1 Δ Ala158 велась методом диффузии паров в висящей капле при температуре 4°C. 4 мкл препарата белка TthL1 Δ Ala158 с концентрацией 11 мг/мл в буфере, содержащем 30 mM Tris-HCl (pH_{25°C} 7.5) и 75 mM NaCl, смешивали с 1 мкл раствора № 10 из набора Clear Strategy Screen I (MDL) и с 1 мкл раствора, содержащем 14% 2-метил-2,4-пентадиол, 250 mM MgCl₂ и уравнивали против 40% ПЭГ₈₀₀₀, 50 mM Tris-HCl (pH_{25°C} 7.5). Кристаллы появлялись в течение 3 дней и росли до максимального размера 0.1 мм x 0.05 мм x 0.02 мм. Кристаллы отражали рентгеновские лучи с разрешением 1.95 Å.

Кристаллизация белка MjaL1+147Ala велась тем же методом, но при температуре 12°C. 2 мкл препарата белка MjaL1+147Ala с концентрацией 14 мг/мл в буфере, содержащем 20 mM Tris-HCl (pH_{25°C} 7.5), 60 mM KCl, смешивали с 1.5 мкл раствора №14 из набора Crystal Screen II (Hampton Research) и уравнивали против 2.1 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM Tris-HCl (pH_{25°C} 6.8). Кристаллы появлялись в течение трех дней и росли до максимального размера 0.1мм x 0.1мм x 0.1мм. Кристаллы отражали рентгеновские лучи с разрешением 3 Å.

Пространственные структуры были определены методом молекулярного замещения совместно с группой структурных исследований рибосомных белков. Анализ полученных данных показал, что делеция аланина в междоменной перетяжке белка TthL1 действительно привела к расхождению доменов белка, а кроме того, к повороту второго домена относительно первого. Таким образом, белок TthL1 вместо закрытой конформации принял открытую, которая, однако, отличалась от конформации этого белка в составе РНК-белкового комплекса.

Для того чтобы количественно охарактеризовать скорость формирования и стабильность комплексов со специфическими фрагментами мРНК и рРНК, мы использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Этот метод позволяет наблюдать кинетику взаимодействия молекул в реальном времени. Полученные сенсограммы обчитываются с помощью программы BIAEvaluation и определяются кинетические константы скоростей ассоциации и диссоциации комплексов, а также кажущиеся константы диссоциации комплексов. В нашей работе мы использовали сенсорные чипы с иммобилизованным авидином (NLS). Модифицированный биотином фрагмент РНК впрыскивали в один из каналов NLS чипа. Второй канал чипа оставляли для сравнения неспецифической сорбции белков с авидином. Раствор белка пропускали по обоим каналам в режиме вычета ППР сигнала свободного канала из сигнала модифицированного канала. ППР сигнал выражается в единицах ответа (РЕ) и прямо пропорционален количеству молекул белка, связанных с РНК. Затем проводили впрыск буфера (мы использовали буфер, содержащий 350мМ NaCl, 5мМ MgCl₂, 50 мМ Tris-HCl (pH_{25°C} 7.5) и 0.005% P-20). Результаты событий, происходящих в реальном времени, были представлены в виде сенсограмм (рис. 14). После окончания эксперимента белки, оставшиеся связанными с РНК на чипе, удаляли промывом 0.1%-0.2% ДСН. Полученные результаты были обработаны с помощью программы BIAevaluation, в качестве теоретической модели использовали модель взаимодействия Лангмюра (1:1). Полученные кинетические константы представлены в таблице 1.

Табл. 1. Кинетический анализ взаимодействия белка L1 и его мутантных форм со специфическими фрагментами мРНК и 23S рРНК. В скобках приведены значения отличий величин констант для мутантных форм белка от их величин для белка дикого типа.

Белок	Константа ассоциации k_a ($1 \times 10^4 / M \cdot s$)		Константа диссоциации k_d ($1 \times 10^{-4} / s$)		Кажущаяся константа диссоциации K_D (нМ)	
	мРНК	23S рРНК	мРНК	23S рРНК	мРНК	23S рРНК
TthL1	5.9	40	1.0	0.06	1.8	0.016
TthL1ΔAla158	6.7(1.1)	46(1.2)	2.5(2.5)	0.09(1.5)	3.7	0.02
IdTthL1	18(3)	95(2.4)	15(15)	0.14(2.3)	8.4	0.015
MjaL1	386	797	2.4	0.02	0.06	0.0003
MjaL1+147Ala	172(2.2)	665(1.2)	33.4(16.7)	0.06(3)	1.94	0.0009

Несмотря на серьёзные конформационные подвижки, РНК-связывающие свойства TthL1 Δ Ala158 изменились незначительно (табл. 1). Раскрытие доменов бактериального рибосомного белка L1 лишь слегка увеличило константы скоростей ассоциации мутантной формы белка с мРНК и рРНК. Таким образом, переход

изолированного белка TthL1 в открытую конформацию практически не повлиял на скорость формирования РНК-белковых комплексов. Это, по-видимому, связано с тем, что положение доменов в свободной мутантной форме все-таки отличается от их положения в составе РНК-белкового комплекса, и доля белка, способного образовать комплекс с РНК, увеличилась в растворе в результате мутации незначительно. Небольшое увеличение константы скорости диссоциации для мутантной формы белка указывает на возможное изменение взаимного положения белка и РНК в комплексе, которое приводит к некоторому уменьшению времени жизни комплекса. В целом, эффект данной замены на РНК-связывающие свойства TthL1 оказался незначительным.

Анализ структуры MjaL1+147Ala показал, что вставка дополнительного аланина привела к изменению взаимного положения доменов. Домены белка сблизались, хотя и не так близко, как в бактериальном белке, и между ними образовалось несколько водородных связей. Скорость ассоциации белка с мРНК уменьшилась, что, по-видимому, предполагает увеличение в растворе, по крайней мере, в два раза, доли белка, неспособного связываться с РНК. Константа скорости диссоциации комплекса MjaL1-мРНК увеличилась более чем на порядок. Это можно объяснить изменением конформации перетяжки, которое приводит к тому, что в данной мутантной форме белок образует с РНК менее плотный контакт, чем белок дикого типа.

В то же время, данная замена почти не сказалась на связывании MjaL1+147Ala с рРНК. По-видимому, наличие двух мест контакта между молекулами в рРНК-белковом комплексе, делает рРНК более «терпимой» по отношению к конформационным изменениям в белке.

3.1.2. Изолированный домен I белка L1

Для выявления влияния закрытой конформации белка L1 на скорость формирования комплексов с РНК мы использовали изолированный первый домен TthL1, поскольку отсутствие второго домена делает область РНК-белкового взаимодействия на домене I доступной для РНК и моделирует открытую конформацию TthL1. Полученные сенсограммы взаимодействия IdTthL1 и TthL1 со специфическими фрагментами рРНК и мРНК представлены на рисунке 14, кинетические константы – в таблице 1.

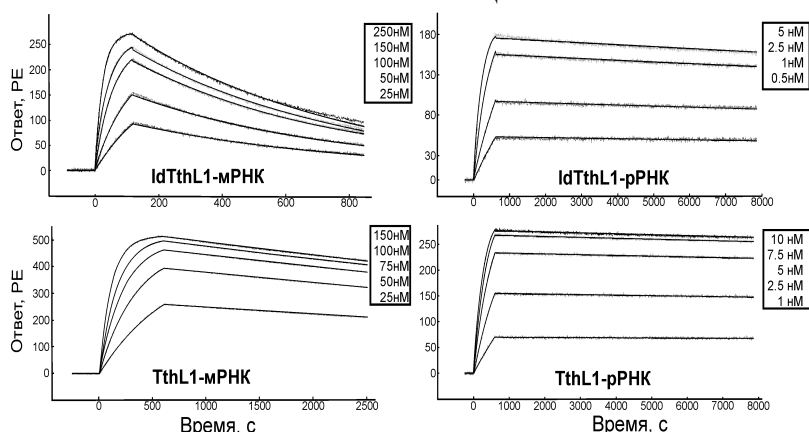


Рис.14. Сенсограммы взаимодействия IdTthL1 и TthL1 со специфическими фрагментами мРНК и рРНК. Толстые линии соответствуют теоретическим кривым.

Для получения более достоверных данных были использованы разные времена ассоциации и диссоциации для характеристики комплексов белков с РНК. Комплексы с рибосомной РНК имеют значительно большее время жизни по сравнению с комплексами с мРНК, поэтому время диссоциации для комплексов с рРНК было увеличено. Для того чтобы достоверно определить константу скорости ассоциации

молекул, мы увеличивали время ассоциации и значения концентраций белка, добиваясь получения насыщения в процессе ассоциации.

Как и ожидалось, для изолированного первого домена константы скоростей ассоциации оказались выше (хотя и не более чем в три раза), чем для интактного белка (табл. 1). Однако константа скорости диссоциации комплекса, образованного изолированным первым доменом, возрастает почти на порядок по сравнению с константой для интактного белка (табл. 1), т.е. присутствие второго домена в белке TthL1 стабилизирует его связывание с мРНК. Детальный анализ структур двух комплексов (TthL1-мРНК и IdTthL1-мРНК) выявил более плотный контакт между интактным TthL1 и мРНК по сравнению с комплексом, образованным изолированным первым доменом. По-видимому, это связано с тем, что в изолированном домене отсутствует лизин в положении 70, который в интактном TthL1 находится в междоменной перетяжке и образует межмолекулярную водородную связь.

Изолированный домен I, так же как и полноразмерный белок, образует более прочный комплекс со специфическим фрагментом рРНК, чем с мРНК. Если для целого белка эта разница может быть объяснена контактами рРНК со вторым доменом, то для изолированного первого домена TthL1 таких дополнительных контактов при моделировании обнаружено не было. Видимо, при связывании происходят какие-то структурные перестройки, которые можно выявить только после определения структуры комплекса изолированного первого домена с рРНК. Это также позволило бы прояснить вопрос, связанный с регуляторной ролью изолированного первого домена. В случае целого белка регуляторные свойства можно объяснить наличием контактов рРНК со вторым доменом белка (Nikulin *et al.*, 2003). По-видимому, при образовании РНК-белковых комплексов изолированный домен I образует большее число водородных связей с рРНК, чем с мРНК.

3.1.3. Мутантные формы белка L1 с точечной заменой остатка глутамата

Анализ кристаллических структур белка L1 в свободном состоянии показал, что боковая цепь Glu42 в TthL1 (соответственно, Glu27 в MjaL1) занимает такое положение, при котором она не должна была бы контактировать с РНК в случае формирования комплекса (рис. 15). Однако, в L1-РНК комплексах положение этой группы иное, и она образует закрытые от растворителя водородные связи - как внутримолекулярную с His44, так и межмолекулярные связи (одну с мРНК или две с рРНК). Можно полагать, что в растворе боковая цепь глутамата находится в динамическом равновесии между положением, соответствующем кристаллической свободной форме белка, и положением, занимаемым в комплексе белка с РНК. Белок может взаимодействовать с РНК только тогда, когда глутамат примет соответствующее положение, поскольку после образования комплекса подстройка этого остатка невозможна.

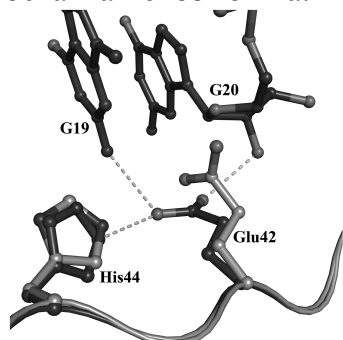


Рис.15. Наложение фрагмента кристаллической структуры белка TthL1, содержащего аминокислотный остаток Glu42 в свободном состоянии (показано светло-серым цветом) и в комплексе с рРНК (показано темно-серым цветом).

Для того чтобы снизить вероятность появления конформации белка, пригодной для образования РНК-белкового комплекса, мы заменили в изолированном домене I TthL1 глутамат на лейцин (табл. 2).

Табл. 2. Кинетические константы взаимодействия IdTthL1 и мутантной формы IdTthL1 E42L со специфическими фрагментами РНК. В скобках приведены значения отличий величины констант мутантной формы белка от величины констант белка дикого типа.

Белок	Константа ассоциации k_a ($1 \times 10^4 / \text{Ms}$)		Константа диссоциации k_d ($1 \times 10^{-4} / \text{s}$)		Кажущаяся константа диссоциации K_D (нМ)	
	мРНК	23S рРНК	мРНК	23S рРНК	мРНК	23S рРНК
IdTthL1	18	95	15	0.14	8.4	0.015
IdTthL1 E42L	2.8(6.43)	13(7.3)	17(1.1)	0.27(1.9)	60	0.2

Кинетические эксперименты показали, что константа скорости ассоциации уменьшилась приблизительно в 7 раз при взаимодействиях IdTthL1 E42L как с мРНК, так и с рРНК. В то же время, предполагаемое уменьшение числа межмолекулярных водородных связей практически не сказалось на константах скоростей диссоциации. Сравнение кристаллических структур изолированного домена I TthL1 в свободном и РНК-связанном состояниях выявило, что гистидин в положении 44 меняет свою конформацию при связывании с глутаматом в положении 42. При замене глутамата на лейцин водородная связь между гистидином и лейцином не образуется, и гистидин может сохранить конформацию, соответствующую свободному состоянию. Это позволяет ему сформировать водородную связь с РНК и таким образом компенсировать потерю водородной связи в результате замены.

Исходя из этих данных, можно сделать вывод, что наличие в структуре свободного белка L1 элементов, конформация которых не соответствует таковой в его структуре в комплексах с РНК, приводит к уменьшению скорости образования комплекса. По-видимому, это связано с тем, что концентрация «активной» формы белка в растворе ниже общей концентрации белка, так как в обоих рассмотренных случаях подстройка после образования комплекса невозможна.

3.2. Влияние изменений рельефа области связывания на РНК-связывающие свойства белка L1

Анализ кристаллических структур комплексов, образованных рибосомным белком L1 с фрагментами рРНК и мРНК показывает, что петля $\beta_9\text{-}\beta_{10}$, содержащая строго консервативную триаду Thr-Met-Gly играет определяющую роль в РНК-белковых взаимодействиях. При незначительной площади (около 11% общей площади контакта) на ее долю приходится около 20% контактов с РНК и более 30% всех недоступных растворителю межмолекулярных водородных связей. Вследствие этого, любые замены в этой области должны приводить к значительной перестройке РНК-белковых контактов и изменять сродство белка к РНК. Мы провели замены треонина и метионина, оставив глицин без изменения, поскольку предполагали, что его замена может привести к нарушению сворачивания белка. Некоторые мутантные формы были закристаллизованы и их структуры определены. Это позволило

сопоставить изменения в рельефе поверхности РНК-белкового интерфейса и в распределении полярных атомов с изменением РНК-связывающих свойств, вызванных заменой.

Треонин в положении 217 является важным компонентом РНК-связывающего интерфейса белка L1; на его долю приходится около 40% всех контактов с РНК, формируемых триадой. Планируя наши замены, мы предполагали создать на поверхности белка выступ (замена на фенилаланин), впадину (замена на аланин) или же оставить рельеф без изменений (замена на валин). Все эти замены дополнительно предполагали устранение недоступной растворителю водородной связи с РНК, формируемой полярным атомом боковой цепи треонина.

Все полученные мутантные формы были закристаллизованы и их структуры определены совместно с группой структурных исследований рибосомных белков нашего института.

Условия кристаллизации одной из мутантных форм (IdTthL1 T217V) представлены здесь. Кристаллизация велась методом диффузии паров в висящей капле при температуре 20°C. 2.5 мкл препарата белка IdTthL1 T217V с концентрацией 12 мг/мл в буфере, содержащем 30мМ Tris-HCl (pH_{25°C} 7.5) и 60мМ KCl, смешивали с 1 мкл раствора №17 из набора Crystal Screen, Hampton Research и 1 мкл 15% МПД и уравнивали против раствора №17 из набора Crystal Screen, Hampton Research. Кристаллы появлялись в течение 2-3 дней и росли до максимального размера 0.35мм x 0.1мм x 0.05мм в течение недели.

Оказалось, что во всех трех случаях на поверхности белка образуется выступ величиной 1-2 Å, смещенный в сторону боковой цепи метионина. Замены треонина на фенилаланин и аланин изменили рельеф поверхности и стабилизировали область РНК-белкового контакта, тогда как замена на валин дестабилизировала ее. Интересно отметить, что в MjaL1 при замене треонина на фенилаланин боковая цепь последнего сформировала стекнинг-взаимодействия с боковыми цепями Met205 и Phe22 и таким образом стабилизировала структуру. В мутантной форме T217A белка TthL1 основную стабилизирующую роль играют две молекулы воды. Отсутствие боковой цепи у аланина позволило этим молекулам воды проникнуть во внутреннюю полость белка, изменив существовавшее ранее взаимное расположение элементов как главной, так и боковых цепей близлежащих аминокислотных остатков. Водородные связи, сформированные водой с полярными атомами белка, стабилизировали структуру (рис. 16).

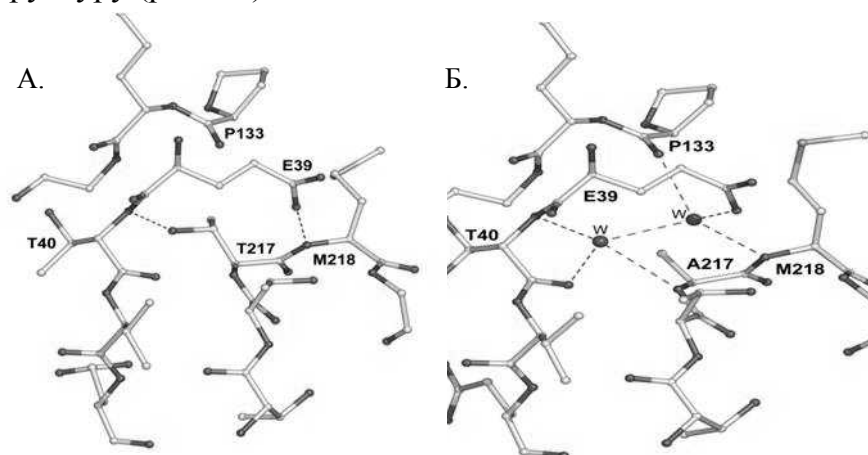


Рис.16: Структурные изменения в РНК-связывающем модуле, произошедшие при замене консервативного треонина (А) на аланин (Б).

Следует отметить, что такие изменения наблюдались только в белке TthL1. В белке MjaL1 данная замена практически не поменяла поверхность РНК-белкового интерфейса. В этой мутантной форме структура поверхности практически не

изменилась, и даже положение C_{β} атома аланина совпадало с положением соответствующего атома в треонине.

Таким образом, наши данные показывают, что корректный анализ изменения РНК-связывающих свойств мутантных форм по сравнению с белком дикого типа возможен только после определения их структур.

Табл. 3. Кинетические константы взаимодействия белков L1 и их мутантных форм со специфическими фрагментами РНК. В скобках приведены значения отличий величин констант мутантных форм белка от величин констант белка дикого типа. Для некоторых мутантных форм исследования взаимодействия с РНК не были проведены.

Белок	Константа ассоциации k_a ($1 \times 10^4 / \text{Ms}$)		Константа диссоциации k_d ($1 \times 10^{-4} / \text{s}$)		Кажущаяся константа диссоциации K_D (нМ)	
	мРНК	23S рРНК	мРНК	23S рРНК	мРНК	23S рРНК
TthL1	5.9	40.0	1.0	0.06	1.8	0.016
T217A	Нет связывания	2.0 (20.0)	Нет связывания	3.1(52.5)	Нет связывания	15.3
T217V	Нет связывания	1.7(23.5)	Нет связывания	62.0 (1033)	Нет связывания	352
M218L	Нет связывания	6.6(6.1)	Нет связывания	20.0 (333)	Нет связывания	31
Id TthL1	18	95	15	0.14	8.4	0.015
T217V	Нет связывания	4.2(22.6)	Нет связывания	224(1600)	Нет связывания	528
T217A	Нет связывания	2.1(45.2)	Нет связывания	3.2(22.8)	Нет связывания	15
T217S	4(4.5)	51(1.9)	40(2.74)	0.54(3.9)	100	0.1
M218K	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
M218L	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
MjaL1	386	797	2.4	0.02	0.06	0.0003
E27A	61(6.3)	Не определялось	13.4(5.6)	Не определялось	2.2	Не определялось
T204A	39(9.9)	Не определялось	120(50.0)	Не определялось	30	Не определялось
T204F	Нет связывания	621(1.3)	Нет связывания	3(150)	Нет связывания	0.05
M205D	Нет связывания	74(10.7)	Нет связывания	0.1(5)	Нет связывания	0.013

Кинетические эксперименты выявили значительное ухудшение РНК-связывающих свойств для всех мутантных форм белка L1 (Kostareva *et al.*, 2010). В основном это ухудшение относится к константам скорости диссоциации, которые изменились на два-три порядка (табл. 3). Формирование комплексов рРНК с

мутантными формами также идет медленнее: для TthL1 T217A и IdTthL1 T217V константы скорости ассоциации уменьшились примерно в 20 раз. Наиболее сильно замены повлияли на сродство мутантных форм к мРНК: во всех исследованных случаях за исключением почти равноценной замены T217S в изолированном домене TthL1 и уже рассмотренной ранее замены T204A в белке MjaL1 образование комплексов с мРНК не наблюдалось. Потеря C γ атома при замене T217S практически не сказалась на РНК-связывающих свойствах белка, тогда как потеря водородной связи при замене T204A в белке MjaL1 привела к 500-кратному ухудшению его сродства к мРНК. Поскольку эта замена не вызвала заметных изменений в структуре области связывания весь эффект может быть отнесен к потере недоступной для воды водородной связи.

Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов некоторых мутантных форм белка с рРНК достаточно низкие (10^{-6} М). Для того чтобы убедиться в специфичности сформированных комплексов, мы исследовали взаимодействие полученных мутантных форм с неспецифическим фрагментом 5S рРНК. К сожалению, интерпретируемые сенсограммы были получены только для мутантной формы TthL1 T217A (рис. 17), поскольку в остальных случаях при использовании концентраций белка, необходимых для проведения экспериментов по связыванию с 5S рРНК, белок агрегировал.

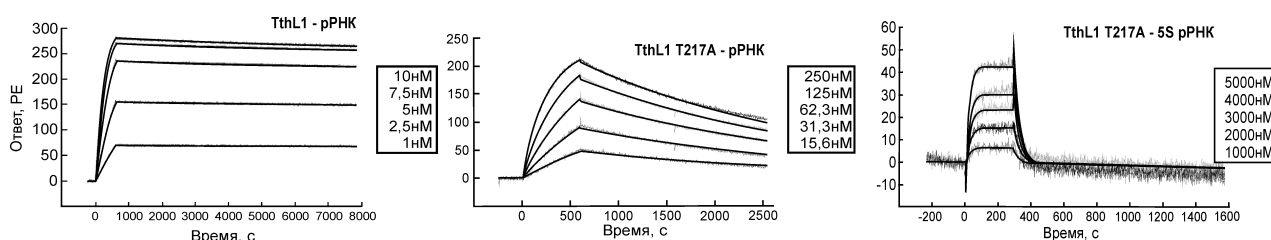


Рис. 17: Сенсограммы, показывающие взаимодействие TthL1, TthL1 T217A с фрагментом 23S рРНК и 5S рРНК. Толстые линии соответствуют теоретическим кривым.

Эксперимент показал, что сродство этой мутантной формы белка к 5S рРНК почти на три порядка ниже ее сродства к 23S рРНК, что подтверждает предположение о специфичности взаимодействий TthL1 T217A с 23S рРНК. Однако остается неясным вопрос, обеспечена ли эта специфичность дополнительными контактами белка и рРНК, поскольку комплекса с мРНК не образуется. Это может быть выяснено только после определения структуры комплекса этой мутантной формы TthL1 с рРНК.

Боковая цепь второго консервативного аминокислотного остатка триады - **метионина** - также участвует в образовании межмолекулярных контактов в комплексах белков TthL1 и MjaL1 со специфическими фрагментами мРНК и рРНК. Нами определены кристаллические структуры двух мутантных форм с заменами метионина на лейцин в TthL1 и на аспарагин в MjaL1. Особенностью этих мутантных форм является значительное изменение параметров элементарных ячеек кристаллов, вызванное изменением упаковки молекул в кристалле. В обоих случаях молекулы в кристалле контактируют участками, входящими в РНК-белковый интерфейс, и, по-видимому, образуют димеры.

Изменение кристаллических контактов приводит к изменению взаимного положения доменов как в TthL1, так и в MjaL1, и к значительным сдвигам главной цепи в районах, пространственно далеко удаленных от точки мутации. Мутация в TthL1 (замена на лейцин) вызывает значительные сдвиги в петлях $\alpha 2$ - $\beta 1$ и $\alpha 7$ - $\beta 9$ и изменяет структуру поверхности области контакта с РНК, тогда как замена

метионина на аспарагин не приводит к заметным изменениям этого участка в белке MjaL1. Тем не менее, обе мутантные формы образуют комплексы с рРНК, хотя и со значительно меньшим сродством, чем белки дикого типа (табл. 3). Взаимодействия в этих комплексах, по-видимому, специфичны, также как и в комплексах, образованных мутантными формами с заменами треонина.

В кристаллической структуре белков семейства L1 как дикого типа, так и мутантных форм, участок, ответственный за связывание с РНК, остается доступным для взаимодействия с РНК. Возможно, что роль метионина заключается в недопущении димеризации свободных белков L1 в клетке.

Замены метионина на лейцин и лизин в изолированном первом домене TthL1 делают его неспособным к образованию комплексов ни с мРНК, ни с рРНК (табл. 3). Эти данные также указывают на то, что специфичность взаимодействий мутантных форм интактных белков с РНК возможна только в присутствии второго домена. Отсюда можно сделать вывод, что полноразмерный белок значительно менее чувствителен к случайным изменениям в его последовательности, чем изолированный первый домен.

Заключение. Таким образом, в данной работе было показано, что уменьшение концентрации «активной» формы свободного белка в растворе уменьшает скорость ассоциации белка с РНК, но практически не влияет на время жизни образующихся комплексов; изменение рельефа поверхности белка в области его связывания с РНК в меньшей степени влияет на скорость образования комплексов, чем на их время жизни. Достоверные выводы о механизме влияния мутаций на функции белка могут быть сделаны только при комбинированном структурно-кинетическом исследовании мутантных форм белка.

ВЫВОДЫ

1. Домен I рибосомного белка L1 необходим и достаточен для специфического связывания белка с рРНК и мРНК.
2. Области контакта белка и РНК в комплексах интактного белка L1 и его домена I практически идентичны.
3. В результате замен в наиболее плотно прилегающей к РНК области поверхности белка L1 во всех случаях на поверхности белка возникает выступ величиной 1-2 Å и на несколько порядков уменьшается время жизни комплексов этого белка с РНК, тогда как скорость образования комплексов меняется слабо.
4. Наличие домена II в целом белке L1 уменьшает константу скорости его ассоциации с РНК, что может быть обусловлено экранированием области РНК-белкового контакта этим доменом в некоторой части свободных молекул L1, т.е. понижением концентрации «активной» формы белка.
5. Повышение гибкости междоменной перетяжки в белке L1 из *M. jannaschii* отрицательно сказалось на РНК-связывающих свойствах белка, тогда как уменьшение её гибкости в белке L1 из *T. thermophilus* практически не изменило эти свойства белка.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Никонова Е.Ю., Волчков С.А., Кляшторный В.Г., Тищенко С.В., Костарева О.С., Невская Н.А., Никонов О.С., Габдулхаков А.Г., Никулин А.Д., Давыдова Н.Л., Стрельцов В.А., Гарбер М.Б., Никонов С.В. Кристаллические структуры мутантных форм рибосомного белка L1.// Молекулярная биология. – 2006 – Т. 40 – С. 688-696.
2. Tishchenko S., Nikonova E., Kljashtorny V., Kostareva O., Nevskaya N., Piendl W., Davydova N., Streltsov V., Garber M. and Nikonov S. Domain I of ribosomal protein L1 is sufficient for specific RNA binding.// Nucleic Acids Res. – 2007 – V. 35(21) – P. 7389-7395.
3. Tishchenko S., Kljashtorny V., Kostareva O., Nevskaya N., Nikulin A., Gulak P., Piendl W., Garber M. and Nikonov S. Domain II of *Thermus thermophilus* ribosomal protein L1 hinders recognition of its mRNA.// J.Mol. Biol. - 2008 - V. 383 – P. 301-305.
4. Kostareva O., Tishchenko S., Nikonova E., Kljashtorny V., Nevskaya N., Nikulin A., Sycheva A., Moshkovskii S., Piendl W., Garber M. and Nikonov S. Disruption of shape complementarity in the ribosomal protein L1-RNA contact region does not hinder specific recognition of the RNA target site.// J.Mol. Recognit. - 2010 – V. 23 – P. 1-9.
5. Никонова Е.Ю., Тищенко С.В., Костарева О.С., Никулин А.Д., Пиндл В., Гарбер М.Б. Кристаллизация регуляторных комплексов рибосомного белка L1 с фрагментами мРНК.// XVII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - Сборник тезисов – 7-10 февраля 2005 - С. 12.
6. 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 *Thermus thermophilus* с фрагментом мРНК *Methanococcus vannielii*.// XVII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - Сборник тезисов – 7-10 февраля 2005 – С.36.
7. Волчков С.А., Кляшторный В.Г., Тищенко С.В., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Невская Н.А., Никонов С.В. Выделение функционально-важных участков на поверхности регуляторного комплекса L1-мРНК.// 9 Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». - Сборник тезисов – 18-22 апреля 2005 - С. 13.
8. Волчков С.А., Кляшторный В.Г., Никонов О.С., Костарева О.С., Тищенко С.В., 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 международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - Сборник тезисов – 7-10 февраля 2006 – С. 6.
9. Tishchenko S., Nikonova E., Kostareva O., Nikulin A., Klyashtorny V., Volchkov S., Nikonov O., Davydova N., Nevskaya N., Nikonov S., Garber M. and Piendl W. Crystallization and structural investigation of regulatory complexes between ribosomal protein L1 and specific mRNA fragments.// International conference on “Protein biosynthesis, structure and function”. - Abstract book – 9-13 June 2007 - P. 20.
10. Костарева О.С., Тищенко С.В., Никонова Е.Ю., Кляшторный В.Г., Гарбер М.Б. Домен I рибосомного белка L1 специфически связывается с РНК.// 12 Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». - Сборник тезисов – 10-14 ноября 2008 - С. 34.
11. Никонова Е.Ю., Костарева О.С., Тищенко С.В., Сычева А.М., Мошковский С.А., Невская Н.А., Гарбер М.Б., Никонов С.В. Структурно-кинетические исследования взаимодействия рибосомного белка L1 со специфическими фрагментами мРНК и рРНК.// Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии,

посвященная 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова. - Сборник тезисов – 28 сентября – 2 октября 2009 - С. 302.

12. Костарева О.С., Корепанов А.П., Тищенко С.В., Никонов С.В., Гарбер М.Б. Исследование способности домена I рибосомного белка L1 встраиваться в рибосому и регулировать экспрессию генов L1-оперона архей.// XXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». - Сборник тезисов – 8-11 февраля 2010 - С. 37.

13. Костарева О.С., Кляшторный В.Г., Никонова Е. Ю. Влияние рельефа поверхности специфического РНК-узнающего модуля рибосомного белка L1 на его взаимодействие с РНК.// XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010». - Сборник тезисов – Секция биология - 12-15 апреля 2010 - С. 201.