

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ им. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА

*На правах рукописи*

**ИВАНОВА Елена Викторовна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СРЕДНЕГО (M)  
ДОМЕНА ФАКТОРА ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eRF1  
ЧЕЛОВЕКА**

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в лаборатории структурно-функциональной геномики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Научные руководители: академик РАН, профессор **Л. Л. Киселев**  
доктор химических наук **В.И. Польшаков**

Официальные оппоненты: член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор **О.А. Донцова**  
доктор биологических наук, профессор **М.Б. Гарбер**

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится “\_\_” \_\_\_\_\_ 2008 г. в часов на заседании Диссертационного совета Д 002.235.01 при Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Автореферат разослан “\_\_” \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат химических наук

**А. М. Крицын**

## Актуальность работы

Механизм терминации трансляции, заключительной стадии биосинтеза полипептидной цепи в эукариотах до настоящего времени остается во многом неустановленным. Ключевую роль в узнавании стоп кодона в А-участке малой субчастицы рибосомы эукариот, передаче терминационного сигнала в большую субчастицу, а также последующем гидролизе сложноэфирной связи в пептидил-тРНК играет белковый фактор терминации трансляции первого класса eRF1. Ранее методом рентгеновской кристаллографии было показано, что молекула eRF1 состоит из трех доменов: N-концевого, или N-домена, среднего, или M-домена, и C-концевого, или C-домена. N-домен ответственен за узнавание стоп кодона матричной РНК. C-домен взаимодействует с фактором терминации второго класса eRF3, который тем самым регулирует активность eRF1. M-домен содержит высококонсервативный трипептидный фрагмент GGQ, необходимый для гидролиза пептидил-тРНК как в эукариотах, так и в прокариотах. Результаты структурных и биохимических исследований указывают на то, что минидомен GGQ располагается в пептидил-трансферазном центре большой субчастицы рибосомы. Абсолютная консервативность GGQ-мотива в факторах терминации первого класса всех живых организмов, указывает на его исключительную роль в процессе терминации трансляции.

Полученная ранее структура eRF1 в кристалле, имеет относительно низкое разрешение, особенно в подвижных функционально важных участках, таких, как, например, петля, содержащая трипептид GGQ, или GGQ-петля. Несмотря на интенсивные исследования в области терминации белкового синтеза, проведенные в последнее десятилетие, многие вопросы остаются невыясненными: каким образом происходит передача терминационного сигнала от малой субчастицы рибосомы к большой, как происходит гидролиз пептидил-тРНК и какую роль в нем играет M-домен eRF1? Для понимания механизма реакции терминации трансляции у эукариот необходимы дальнейшие углубленные исследования структуры, динамических свойств и функцио-

нальных особенностей отдельных доменов eRF1. Поэтому исследования в данном направлении представляются актуальными. Для определения структуры белка в растворе в последние годы широко используется спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Методы ЯМР позволяют также определить динамические свойства белка и исследовать его взаимодействие с другими биомолекулами. Для изучения функциональных особенностей eRF1 и роли его отдельных аминокислотных остатков в процессе терминации использован точечный мутагенез с последующим тестированием активности фактора.

### **Цели и задачи исследования**

Целями данной работы являются определение структуры высокого разрешения М-домена eRF1 человека в растворе, изучение его динамических свойств, связывание М-домена eRF1 с рибосомой эукариот и определение функциональной роли минидомена GGQ в механизме терминации трансляции. Для достижения этих целей сформулированы следующие задачи: 1) получение высокоочищенных препаратов М-домена eRF1 человека меченых стабильными изотопами  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ ; 2) получение меченого препарата мутантной формы М-домена eRF1 Gly183Ala, неактивного в функциональных тестах; 3) измерение и последующий анализ гетероядерных 2D и 3D спектров ЯМР для расчета структуры М-домена и определения его динамических свойств; 4) изучение взаимодействия М-домена eRF1 с рибосомами эукариот; 5) выполнение точечных замен аминокислотных остатков в GGQ-петле М-домена eRF1 методом сайт-направленного мутагенеза; 6) выделение, очистка и исследование функциональной активности полученных мутантных форм eRF1 человека.

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

Впервые определена структура высокого разрешения в растворе М-домена eRF1 человека и изучены его динамические свойства. Выявлена повышенная скорость обмена амидных протонов минидомена GGQ с водой.

Наиболее вероятной причиной наблюдаемых эффектов является координация молекул(ы) воды остатками Gly183 и Gly184 этого функционально важного участка белка. Показано, что М-домен eRF1 селективно связывается с большой 60S субъединицей рибосомы эукариот. Найдены аминокислотные остатки М-домена, образующие интерфейс такого взаимодействия. Исследован функциональный вклад каждого из инвариантных и полуконсервативных аминокислотных остатков в составе минидомена GGQ. На основании полученных структурных и функциональных данных впервые предложен механизм реакции гидролиза пептидил-тРНК в пептидил-трансферазном центре рибосомы, в котором eRF1 служит катализатором.

Результаты представленной работы существенно углубляют понимание молекулярного механизма терминации белкового синтеза у эукариот, что имеет важное значение для детального изучения процесса синтеза белка в эукариотической клетке в целом. Кроме того, изучение структурных и функциональных особенностей eRF1 позволит в будущем разрабатывать новые методы коррекции наследственных дефектов и лечения различных заболеваний, связанных с преждевременной терминацией синтеза белка в клетке, вызванной появлением нонсенс-мутаций в кодирующей части мРНК.

### **Апробация работы**

Материалы работы были представлены на следующих международных конференциях: Meeting on Translational Control (6-10 сентября, 2006, Cold Spring Harbor, США); The 8<sup>th</sup> International Engelhardt Conference on Molecular Biology, RNA-Protein Interactionс (19-24 августа, 2006, Пансионат «Буря», Московская обл., Россия); Trends in Transient Interactionс between Biological Macromolecules, FEBS Workshop (16-19 мая, 2007, Севилья, Испания); Protein Synthesis and Translational Control (12-16 сентября, 2007, Хайдельберг, Германия); Advances in NMR of protein and nucleic acid molecular recognition, NMR Meeting “Focusing NMR on the machinery of Life” (16-18 октября 2008, Мюнхен, Германия).

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на \_\_\_\_\_ страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы (\_\_\_\_\_ наименований). Диссертация содержит \_\_\_\_\_ рисунков и \_\_\_\_\_ таблиц.

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **Получение и очистка меченого стабильными изотопами препарата М-домена eRF1 человека и его мутантной формы Gly183Ala**

Генно-инженерные конструкции на основе трансляционного вектора pET23b(+) (Novagen), кодирующие полипептидную цепь М-домена eRF1 человека (со 140 по 275 аминокислоту) и его мутантной формы Gly183Ala, в клетках *E. coli* получены в нашей лаборатории ранее. Методом сверхэкспрессии в клетках *E. coli* в минимальной среде M9, содержащей сульфат аммония-<sup>15</sup>N и глюкозу-<sup>13</sup>C, получены препараты белков, меченые указанными стабильными изотопами. Методика выделения рекомбинантных белков была аналогична методике, описанной ранее для выделения целого белка eRF1 (Frolova et al., 1994). Выделенные белки были дополнительно очищены с помощью ионообменной хроматографии в системе АКТА («GE Healthcare», Великобритания) с использованием колонки HiTrap SP объемом 1 мл.

### **Клонирование и экспрессия eRF1, несущих точечные мутации в М-домене, и определение их функциональной активности**

Мутантные формы eRF1 получали сайт-направленным мутагенезом, который проводили с помощью ПЦР по методу “мегапраймера”. В качестве матричной ДНК использовали плазмиду pERF4B, кодирующую полноразмерный ген *erf1* человека. На первом этапе, с помощью ПЦР получали фрагмент ДНК, несущий требуемую замену с использованием соответствующего

«мутагенного» праймера и одного из праймеров, комплементарного к 5'- или 3'- концу гена. Полученный фрагмент очищали в легкоплавкой агарозе и использовали в следующем раунде ПЦР в качестве «мегапраймера» в паре с одним из праймеров, комплементарным к 3'- или 5'- концу гена. Достроенный таким образом фрагмент далее клонировали в заранее подготовленный вектор pERF4B. Плазмиды с нужной мутацией отбирали секвенированием, после чего трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 для выделения мутантного белка. Рекомбинантные белки выделяли в соответствии с описанным ранее методом (Frolova et al., 1994). RF-активность, связывание с предтерминационным комплексом и способность вызывать конформационные перестройки определяли *in vitro* с помощью реконструированной эукариотической системы трансляции (RETS) (Alkalaeva et al., 2006).

### **ЯМР спектроскопия и расчет структуры**

Гетероядерные 3D спектры HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNHAHB, HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, HNHB, [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N] NOESY-HSQC, [<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C] NOESY-HSQC и 2D спектры <sup>15</sup>N-HSQC, <sup>13</sup>C-HSQC, DQF-COSY и NOESY были измерены при 5°C и 25°C на спектрометрах ЯМР Varian INOVA 600 и 800 MHz, а также Bruker AVANCE 600 MHz. Обработка и анализ спектров выполнен с использованием программ NMRPipe, Sparky и RelaxFit. Расчет структуры белка выполнен методом молекулярной динамики с наложенными экспериментальными ограничениями с использованием программ CHC, XPLOR-NIH и ARIA. Анализ качества рассчитанных структур выполнен с помощью программ AQUA, PROCHECK-NMR и MolMol. Анализ динамических свойств белка проведен с использованием программ TENCOR-2 и RelaxFit. Визуализация и анализ структурных данных выполнена с помощью программ IncightII (Accelrys Inc.), VMD и MolMol.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

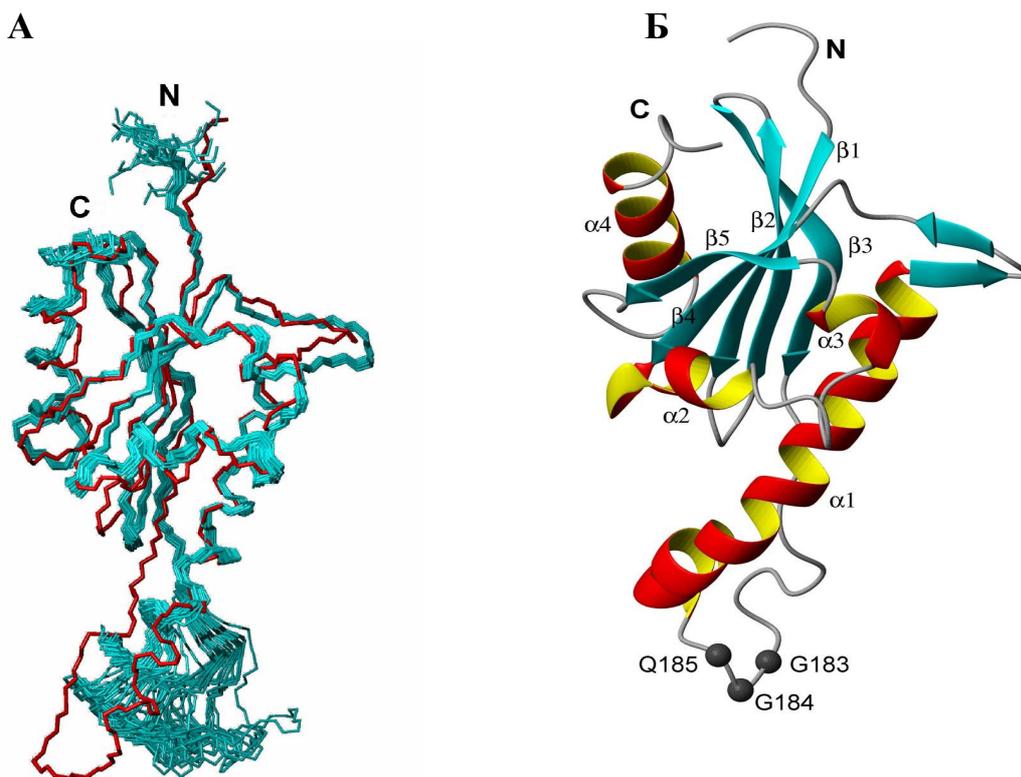
### 1. Структура М-домена eRF1 человека в растворе

Анализ спектров ЯМР, измеренных при температурах 278 и 298К, позволил получить 2338 ограничений на межъядерные расстояния, торсионные углы и ориентацию связей N-H. Эти данные использованы для расчета семейства 25 структур ЯМР, показанных на рис. 1А. Из рассчитанных 25 конформеров определена репрезентативная структура, дающая наименьшую сумму среднеквадратичных отклонений координат тяжелых атомов полипептидной цепи (C $\alpha$ , C и N) при суперпозировании на нее всех остальных членов семейства. Величина такого среднеквадратичного отклонения не превышала 0.9Å. Если исключить из анализа наименее структурированный фрагмент GGQ-петли, значение среднеквадратичных отклонений координат атомов остальной белковой цепи не превышает 0.4Å, что соответствует структуре высокого разрешения. Структурные данные размещены в Protein Data Bank под кодом 2HST.

Топология М-домена eRF1 человека представляет собой  $\beta$ -ядро, формируемое пятью  $\beta$ -листами (как параллельными, так и антипараллельными), окруженное четырьмя  $\alpha$ -спиралями:  $\alpha$ 1- $\alpha$ 4 (рис. 1Б). Структура содержит несколько петель, самой длинной из которых является GGQ-петля.

Структура М-домена eRF1 человека в растворе близка к установленной ранее структуре в кристалле (Song et al., 2000), однако далеко ей не идентична (рис. 1А). Величина среднеквадратичных отклонений для атомов белковой цепи (C $\alpha$ , N, O и C) при суперпозиции 25 структур ЯМР на структуру в кристалле составляет  $3.8 \pm 0.2$ Å. Наиболее заметны различия в ориентации GGQ-петли и ее переходе в спираль  $\alpha$ 1. Обнаружены также различия в геометрии участков 194-197, 213-219, 237-245 и 258-260. Все перечисленные участки, кроме 194-197, соответствуют петлям, соединяющим элементы вторичной структуры. Таким образом, различия между структурой М-домена eRF1 в кристалле и его структурой в растворе заключаются преимущественно в ори-

ентации петель и  $\alpha$ -спиралей относительно  $\beta$ -ядра белка. Они могут быть обусловлены вероятными эффектами кристаллической упаковки, влиянием соседних С- и N-доменов на структуру М-домена в составе целого eRF1 в кристалле и/или неточностью определения координат некоторых участков белка из-за низкого разрешения кристаллической структуры eRF1.

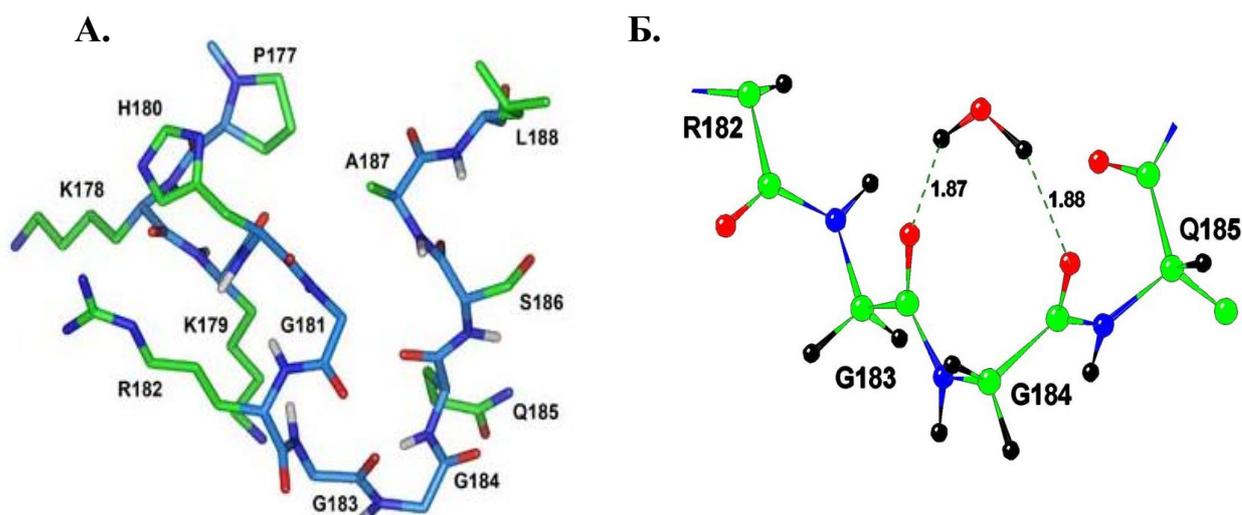


**Рисунок 1.** Структура М-домена eRF1 человека в растворе. **А.** Суперпозиция семейства 25 структур ЯМР. Голубым цветом показаны атомы основной белковой цепи (C $\alpha$ , N и C) семейства структур ЯМР. Красным цветом показана структура М-домена eRF1 человека в кристалле суперпозированная на репрезентативную структуру белка в растворе. **Б.** Топология репрезентативной структуры М-домена eRF1 человека с указанием элементов его вторичной структуры.

Самой неупорядоченной частью структуры М-домена eRF1 является GGQ-петля (177-187) (рис. 1А). Однако, поскольку именно этот участок наиболее важен в функциональном отношении, его структура представляет особый интерес. При температуре 298К на спектрах, измеренных для М-домена eRF1, сигналы амидных протонов участка 177-187 белковой цепи отсутствовали. Тем не менее, их удалось детектировать и отнести в спектрах мутантной формы М-домена Gly183Ala, а также в спектрах М-домена измеренных при температуре ниже 288К. Исчезновение сигналов при 298К ука-

зывает на наличие быстрого обмена амидных протонов с водой. Существует две вероятные причины такого быстрого обмена: (а) данный участок белковой цепи координирует одну или несколько молекул воды, ускоряет обмен амидных протонов; (б) локальная величина рН данного участка белка превышает 8, что приводит к ускоренному обмену HN с водой за счет основного катализа.

Значительное снижение скорости обмена амидных протонов при замене Gly183Ala, не влияющей на распределение заряда в минидомене GGQ и, следовательно, на значение локального рН, свидетельствует о том, что, наиболее вероятной причиной быстрого обмена амидных протонов в GGQ-петле является координация молекулы (или молекул) воды. Согласно данным динамических измерений (см ниже) GGQ-петля претерпевает высокоамплитудные движения. Вместе с тем среди множества конформеров можно определить конформацию GGQ-петли с наибольшей населенностью, т.е. наиболее энергетически выгодную (рис. 2А).



**Рисунок 2.** А. Расчетная наиболее энергетически выгодная структура минидомена GGQ, соответствующая репрезентативной структуре петли 175-189. Б. Гипотетическая модель координации молекулы воды в GGQ-петле.

На этой структуре карбонильные группы Gly183 и Gly184 практически параллельны друг другу и их геометрия позволяет формировать водородные связи с координируемой молекулой воды. На рис. 2Б показана модель координации GGQ-петли с молекулой воды. Такая модель не является единствен-

но возможной. Амидные группы тех же аминокислотных остатков, Gly183 и Gly184 также практически параллельны друг другу и направлены в противоположную карбонильным группам сторону петли. Такая геометрия позволяет формировать водородные связи с акцепторами, которыми могут быть атомы кислорода молекулы воды или, например, нуклеотидные основания тРНК.

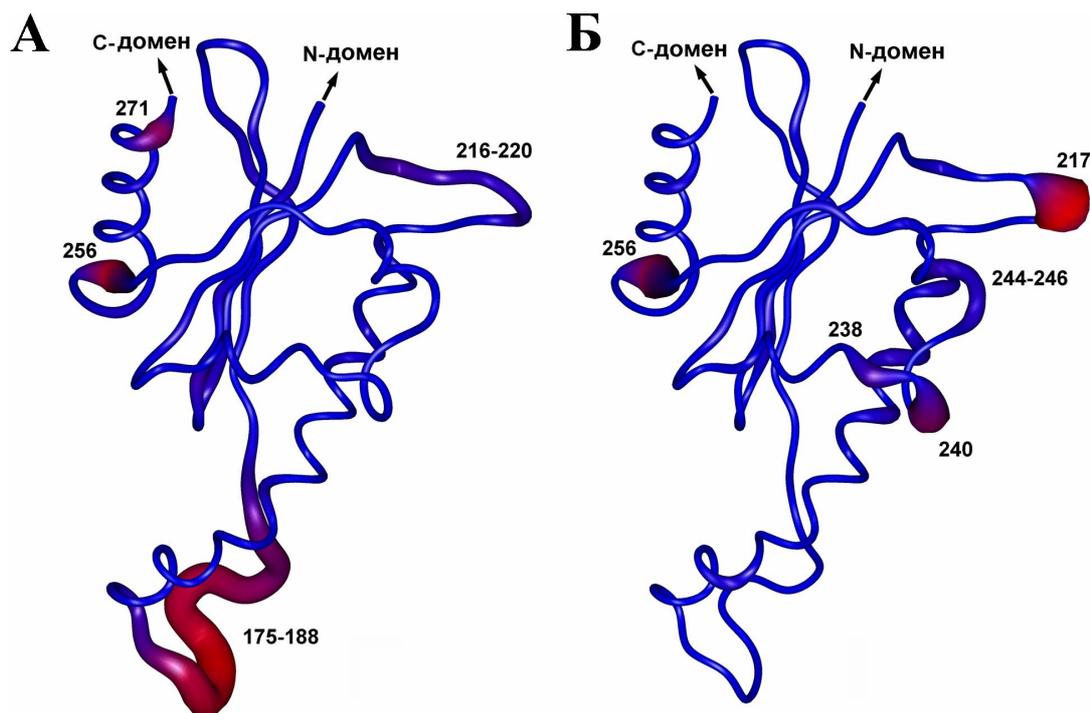
Очевидно, что экспериментально обнаружить такую молекулу воды методом ЯМР, и тем более, измерить время ее жизни в координированном состоянии невозможно, ввиду быстрой динамики GGQ-петли. Данные экспериментов по релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  (см ниже) позволяют предполагать, что время ее жизни не может превышать нескольких нс. Вместе с тем, при связывании eRF1 с рибосомой и формировании терминационного комплекса, подвижность белковой цепи M-домена должна снижаться и, в таком случае, время жизни молекулы воды в координированном состоянии может оказаться достаточным для ее участия в реакции гидролиза.

### **Влияние замены Gly183Ala на структурные свойства M-домена eRF1 человека**

В дополнение к определению структуры M-домена eRF1 человека дикого типа, был проведен анализ структуры мутанта Gly183Ala. Из функциональных исследований (Frolova et al., 1999) известно, что замена Gly183Ala в белке eRF1 приводит к полной потере его активности. Анализ спектров ЯМР мутанта Gly183Ala M-домена показал, что данная мутация не вызывает существенных изменений как в структуре M-домена в целом, так и в конформации петли 177-187: химические сдвиги сигналов M-домена дикого типа и мутанта Gly183Ala совпадают даже для аминокислотных остатков близких к точке замены. Вместе с тем, такая замена вызывает существенное уменьшение скорости обмена амидных протонов с водой, в результате чего при температуре 298K детектируются все сигналы петли 177-187, не наблюдаемые при данной температуре у M-домена eRF1 дикого типа. Таким образом, мутация Gly183Ala меняет лишь локальную конформацию минидомена GGQ, что, в свою очередь, может нарушать координацию молекул(ы) воды.

## Динамические свойства М-домена eRF1

Информация о динамических свойствах М-домена eRF1 получена в результате анализа экспериментально измеренных скоростей релаксации ядер  $^{15}\text{N}$  амидных групп и величин кросс-релаксации  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  (рис. 3).



**Рисунок 3.** Представление белковой цепи М-домена eRF1 человека в виде трубки, ширина которой соответствует относительной амплитуде внутренних движений белковой цепи. **А.** Быстрые движения (от пс до нс): ширина пропорциональна величине  $1-S^2$ , где  $S^2$  – параметр порядка, рассчитанный из релаксационных экспериментов. **Б.** Медленные (мс) конформационные перегруппировки: ширина цепи пропорциональна величине  $R_{ex}$  – увеличению скорости поперечной релаксации за счет химического обмена.

Установлено, что наибольшей амплитудой движений, происходящих в шкале времени от пс до нс в М-доме eRF1 обладает GGQ-петля. Кроме того, в спектрах  $^{15}\text{N}$ -HSQC, измеренных при 278К, аминокислотные остатки Gly181, Gly183 и Gly184 наблюдаются в виде групп сигналов различной интенсивности, что свидетельствует о существовании данного фрагмента белковой цепи в виде смеси конформеров, переходящих друг в друга в шкале времени от мс и выше. Эти факты указывает на сложный характер динамики GGQ-петли, включающей как быстрые движения белковой цепи, так и более медленные конформационные перестройки.

Вторым наиболее подвижным фрагментом М-домена оказалась петля, находящаяся на противоположном мотиву GGQ конце длинной спирали  $\alpha 1$ .

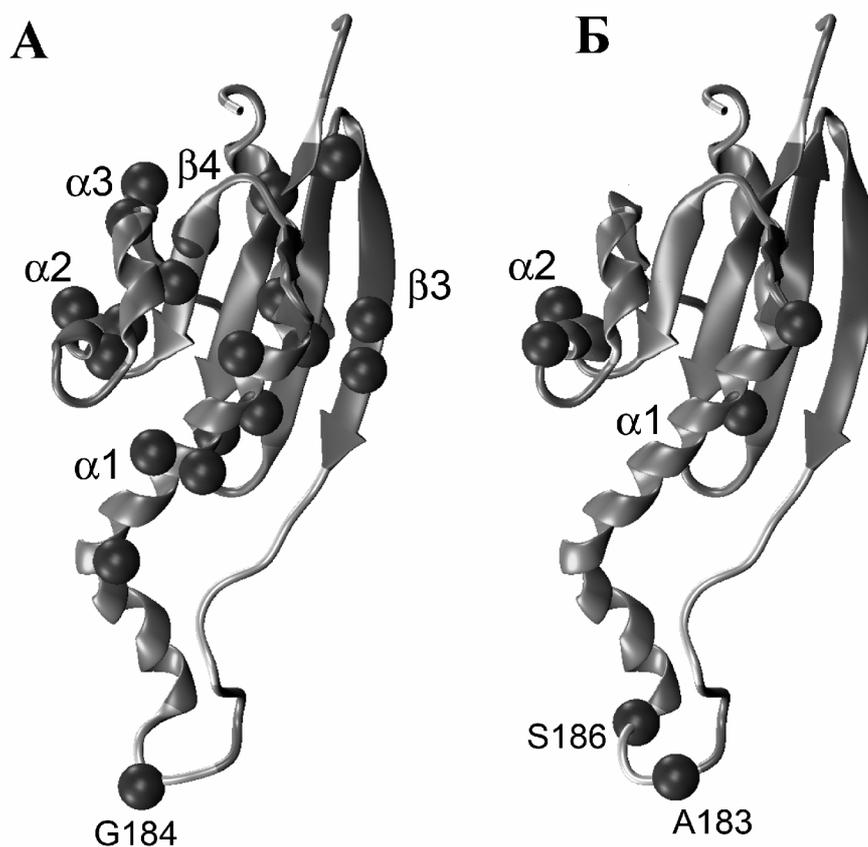
Эта относительно короткая петля (позиции 215-223) претерпевает как быстрые (в шкале времени порядка 1 нс), так и более медленные (миллисекундные) движения.

Подвижность этих двух петель может иметь роль в поддержании конформационной пластичности белка для его эффективного связывания с рибосомой. Вместе с тем, обращает на себя внимание тот факт, что петля 215-223 располагается на стыке М- и N-доменов eRF1 и с GGQ петлей ее разделяет длинная спирали  $\alpha 1$ . Это позволяет предполагать, что спираль  $\alpha 1$  может служить медиатором передачи терминационного сигнала от N-домена к функционально важной GGQ-петле посредством изменения конформации петли 215-223.

## **2. Взаимодействие М-домена eRF1 человека с рибосомой эукариот**

В нашей лаборатории ранее было показано с помощью биохимических тестов, что МС-домен eRF1 способен связываться с рибосомой. Анализ структуры комплексов прокариотических факторов терминации с рибосомами позволяет предполагать, что М-домен eRF1 может связываться с 60S субъединицей рибосом эукариот. Для определения интерфейса взаимодействия М-домена eRF1 человека с рибосомами эукариот был проведен мониторинг изменения интенсивности сигналов ЯМР аминокислотных остатков белка в процессе титрования его рибосомами. При молярных соотношениях белка к 60S субъединице рибосомы выше 5000:1 видимых изменений в интенсивности и ширине сигналов спектрах  $^{15}\text{N}$ -HSQC не наблюдается. При последующем увеличении концентрации 60S субъединиц интенсивность сигналов белка уменьшается в соответствии с изменением молярного соотношения белок/рибосома в растворе. При молярных соотношениях белка к рибосоме менее 3000:1 наблюдается практически полное исчезновение всех сигналов из спектров HSQC. Наиболее значимые изменения в спектрах происходят в довольно узком диапазоне соотношений белка и 60S субъединиц рибосом от 4500:1 до 4000:1. В данном диапазоне интенсивность сигналов аминокислот-

ных остатков белка, находящиеся в непосредственном контакте с рибосомой, уменьшается наиболее быстро, что позволяет идентифицировать интерфейс контакта белок-рибосома.



**Рисунок 4.** Аминокислотные остатки, интенсивность которых уменьшается наиболее заметно при взаимодействии М-домена eRF1 человека с 60S субъединицей рибосомы. Крупными шарами показаны атомы C $\alpha$  таких аминокислотных остатков. **А.** Белок дикого типа. **Б.** Мутант G183A.

Аминокислотные остатки белка, формирующие интерфейс взаимодействия с рибосомой, преимущественно расположены вдоль длинной  $\alpha$ -спирали М-домена (рис. 4А). Кроме того, ряд аминокислотных остатков соседних к  $\alpha 1$  и расположенных на  $\beta$ -листовом тяжё  $\beta 5$  и двух коротких  $\alpha$ -спиралях  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  также вовлечены в формирование контакта белок-рибосома. Уменьшение интенсивности сигналов F146, V225 и L226, расположенных не на поверхности белка, а в его  $\beta$ -ядре, может быть обусловлено их малой подвижностью и близостью к интерфейсу взаимодействия с рибосомой.

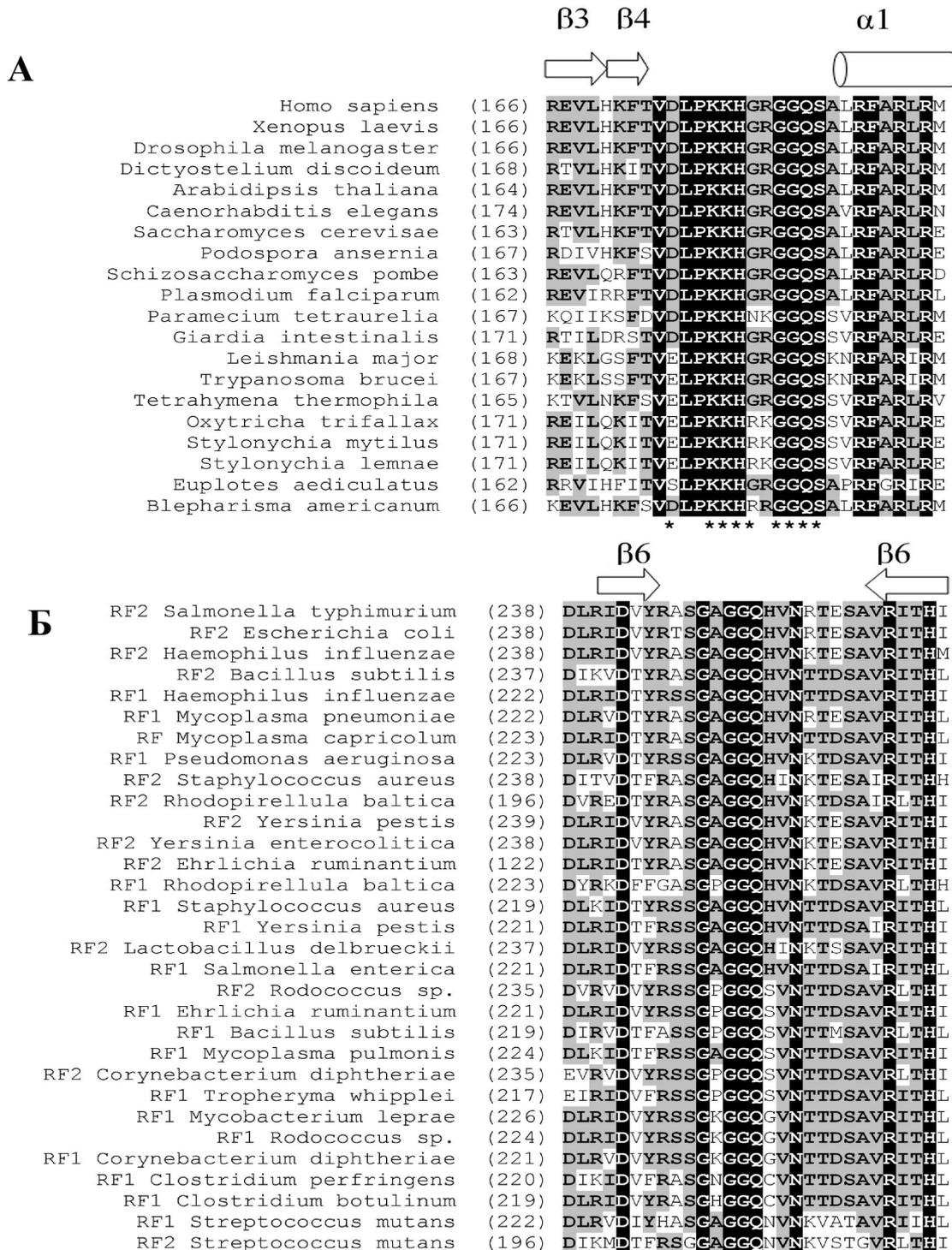
Установлено, что М-домен eRF1 связывается специфически с большой 60S субъединицей рибосомы: аналогичного взаимодействия с малой 40S субъединицей не обнаружено.

Взаимодействие функционально неактивного мутанта G183A с 60S рибосомой оказалось, хотя и специфичным, но существенно более слабым по сравнению с белком дикого типа. Кроме того, интерфейс взаимодействия не идентичен для дикой формы белка и мутанта (рис. 4B). Полученные результаты подтверждают высказанное выше предположение о функциональной роли длинной спирали  $\alpha 1$  М-домена и указывают на то, что конформационная подвижность GGQ петли важна для образования плотного контакта белок-рибосома.

### **3. Функциональная роль аминокислотных остатков минидомена GGQ**

Минидомен GGQ содержит высокий процент инвариантных и полуконсервативных аминокислотных остатков (рис. 5). Такая высокая консервативность может быть обусловлена в большей степени функциональной ролью этих аминокислотных остатков, чем их участием в образовании трехмерной структуры, так как обычно одиночные замены в петлевых участках белка не приводят к существенным изменениям стабильности белка и его конформации. Следует отметить, что, помимо других аминокислотных остатков, минидомен GGQ содержит инвариантные His и Ser, абсолютной консервативностью которых также характеризуются некоторые классы гидролаз. Анализ первичной структуры GGQ-петли позволил предположить, что eRF1 непосредственно участвует в реакции гидролиза сложноэфирной связи в пептидил-тРНК в пептидил-трансферазном центре рибосомы. Для проверки этой гипотезы и установлении роли отдельных аминокислотных остатков минидомена GGQ в гидролизе пептидил-тРНК нами проведен анализ мутантов eRF1, содержащих замены в следующих позициях: Asp175, Lys178, Lys179, His180, Gly181, Gly183, Gly184, Gln185, Ser186 и Arg189. Полученные мутанты исследовали на их способность связываться с предтерминаци-

онным комплексом (pre-TC) и вызывать конформационные перестройки, а также определяли RF-активность (табл.1).



**Рисунок 5.** Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей минидомена GGQ эукариотических (А) и прокариотических (Б) факторов терминации трансляции первого класса. Белым на черном фоне выделены абсолютно консервативные аминокислотные остатки, черным на сером фоне выделены полуконсервативные аминокислотные остатки. Над последовательностью показаны элементы вторичной структуры. Звездочкой помечены позиции, в которые вводились замены (см. Табл.1).

## **Связывание мутантных форм eRF1 с предтерминационным комплексом и их способность вызывать конформационные перестройки**

Способность eRF1 вызывать конформационные перестройки предтерминационного комплекса (pre-TC) и связывание с ним без их индукции отражают два различных типа связывания фактора: (i) функционально значимое связывание, в результате которого происходят конформационные изменения в pre-TC, и при котором eRF1 оказывается в функционально активном участке, и (ii) связывание, которое не вызывает указанных изменений и не несет функциональной роли.

В целом, замены оказывают гораздо менее значимый эффект на связывание eRF1 с pre-TC, по сравнению с их влиянием на способность вызывать конформационные перестройки (табл.1). Замены в положениях Asp175, Gly181 и Gln185 не оказывают существенного влияния как на связывание, так и на конформационные перестройки pre-TC. Мутантные формы eRF1 по Lys178 и Lys179 сохраняют способность к связыванию и индукции конформационных перестроек в том случае, если происходит замена на положительно заряженные аминокислотные остатки. При замене Lys178 на Asp фактор перестает вызывать конформационные перестройки, а связывание его с pre-TC падает примерно на 50%. Значительное влияние на способность вызывать конформационные изменения pre-TC оказывают замены в положении Arg189. При замене этого остатка на Ala или Gln способность вызывать конформационные перестройки практически исчезала, тогда как связывание указанных мутантных форм eRF1 сохранялось на уровне 80%. Только при замене аргинина на положительно заряженный лизин индукция конформационных перестроек сохранялась примерно на 50%. Возможно, инвариантные Arg189, Lys179 и Lys178 участвует во взаимодействии GGQ-петли с отрицательно заряженной пептидил-тРНК и/или 28S рРНК.

**Таблица 1.** Функциональные характеристики мутантных форм eRF1 человека.

№		Конформационные перестройки <sup>а</sup>	Связывание <sup>б</sup>	Гидролиз пептидил-тРНК <sup>в</sup>
1	pre-TC	0	0	0,0
2	eRF1	100	100	100,0
3	D175H	74	100	86,5
4	D175S	94	95	92,8
5	D175N	100	102	99,1
6	D175R	100	85	115
7	K178R	90	105	97,3
8	K178A	66	84	53,5
9	K178I	32	75	15,3
10	K178D	8	59	4
11	K179R	91	104	92,9
12	K179A	20	81	17
13	K179I	32	90	7,8
14	KK/AA	10	59	10
15	H180I	56	105	5,5
16	H180A	51	104	5,7
17	H180R	63	103	3,0
18	H180E	21	79	5,0
19	H180S	83	102	11,6
20	H180D	8	81	3,1
21	G181R	100	106	103,9
22	G181S	92	104	95,7
23	G183A	64	100	5,2
24	G183S	31	88	6
25	G183R	63	94	0
26	G184A	51	100	5,3
27	G184S	7	65	9,3
28	G184L	11	87	5
29	Q185G	92	104	14,5
30	Q185N	100	103	15,1
31	Q185R	99	104	15,2
32	Q185E	45	99	8,6
33	Q185I	100	103	3
34	S186T	37	93	9
35	S186A	57	100	27
36	S186L	61	103	3,6
37	S186H	46	101	2
38	R189A	0	83	6
39	R189Q	0	82	1
40	R189K	44	98	16

Все данные представлены в %%. (а) интенсивность сдвига предтерминационного комплекса (pre-TC) на +2 нуклеотида по матрице MVHL-стоп мРНК, сопровождающегося гидролизом MVHL-тРНК, в RETS, (б) интенсивность сдвига pre-TC на +4 нуклеотида по CPV-стоп мРНК, не сопровождающегося гидролизом MVHL-тРНК, (в) высвобождение <sup>35</sup>S-меченного тетрапептида MVHL из пептидил-тРНК.

## **Анализ RF-активности мутантных форм eRF1**

Замены переменных аминокислотных остатков Glu175 и Gly181 не влияли на RF-активность. eRF1, содержащий мутации в положениях Lys178 и Lys179, сохранял RF-активность только в случае замены на положительно заряженный аргинин. Остальные мутанты по этим позициям теряли активность либо полностью, либо частично. Схожие результаты получены и при замене Arg189. Мутации Arg189Ala и Arg189Gln приводили к потере, как способности вызывать конформационные перестройки, так и гидролизовать пептидил-тРНК. Сохраняющая положительный заряд мутация Arg189Lys также вызывала снижение активности, однако, в меньшей степени.

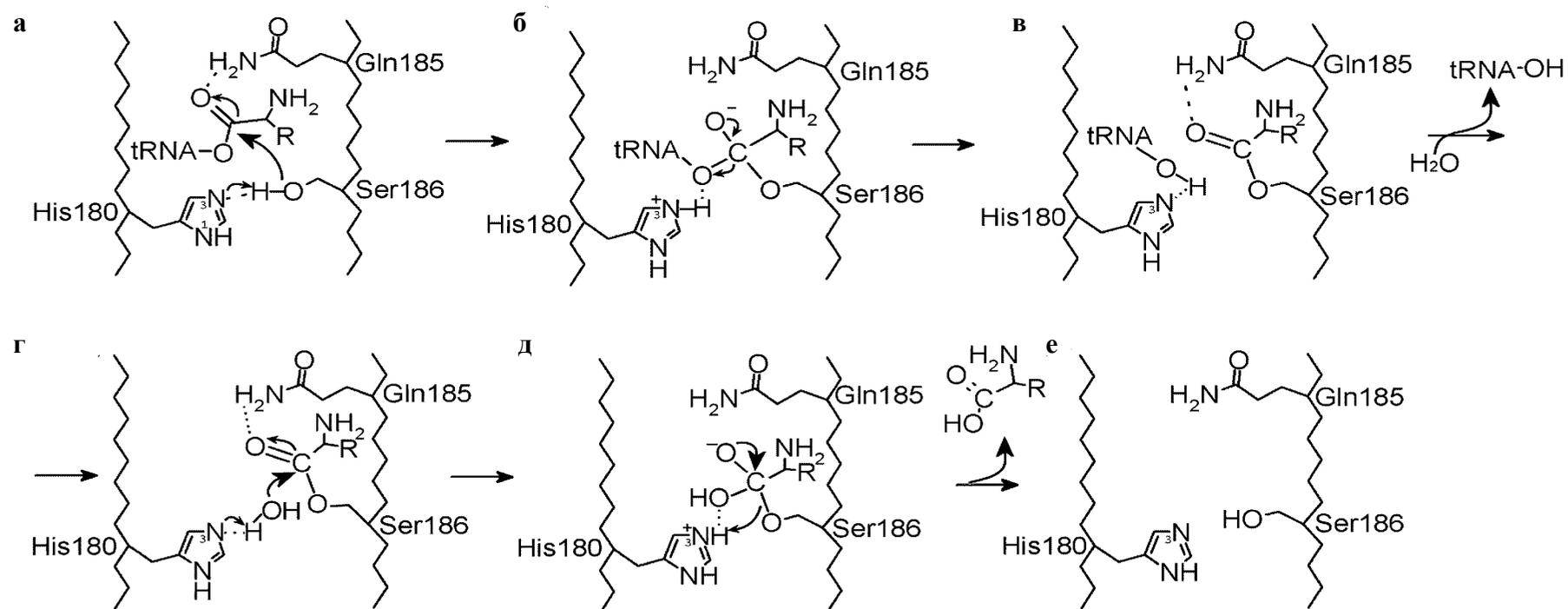
Все исследованные замены в положении His180 приводили к полной инактивации eRF1. К потере способности eRF1 вызывать гидролиз пептидил-тРНК приводили также замены в положениях Gly183 и Gly184, что подтверждает данные, полученные ранее. Кроме вышеперечисленных остатков, для поддержания активности eRF1 абсолютно необходимы Gln185 и Ser186. Замены этих инвариантных аминокислотных остатков даже на химически близкие (Gln185Asn, Ser186Thr) приводили к значительной потере активности. Следует отметить, что замены в положениях His180, Gly183, Gly184, Gln185 и Ser186 не влияют на связывание eRF1 с pre-ТС, кроме мутации Gly184Ser, приводящей к уменьшению уровня связывания до 65% от исходного. Можно предполагать, что эффект мутации Gly184Ser связан с потерей подвижности GGQ-петли и невозможностью ее корректного позиционирования в РТС.

## **Возможный механизм гидролиза пептидил-тРНК в пептидил-трансферазном центре рибосомы эукариот**

На основании полученной нами трехмерной структуры М-домена eRF1 и функционального анализа мутантных форм eRF1 можно предложить следующий вероятный механизм гидролиза пептидил-тРНК в РТС, в котором eRF1 является катализатором (рис. 6).

На первой стадии формируется водородная связь между карбонильным атомом кислорода пептидил-тРНК и NH<sub>2</sub>-группой Gln185 (рис. 6а). Другая

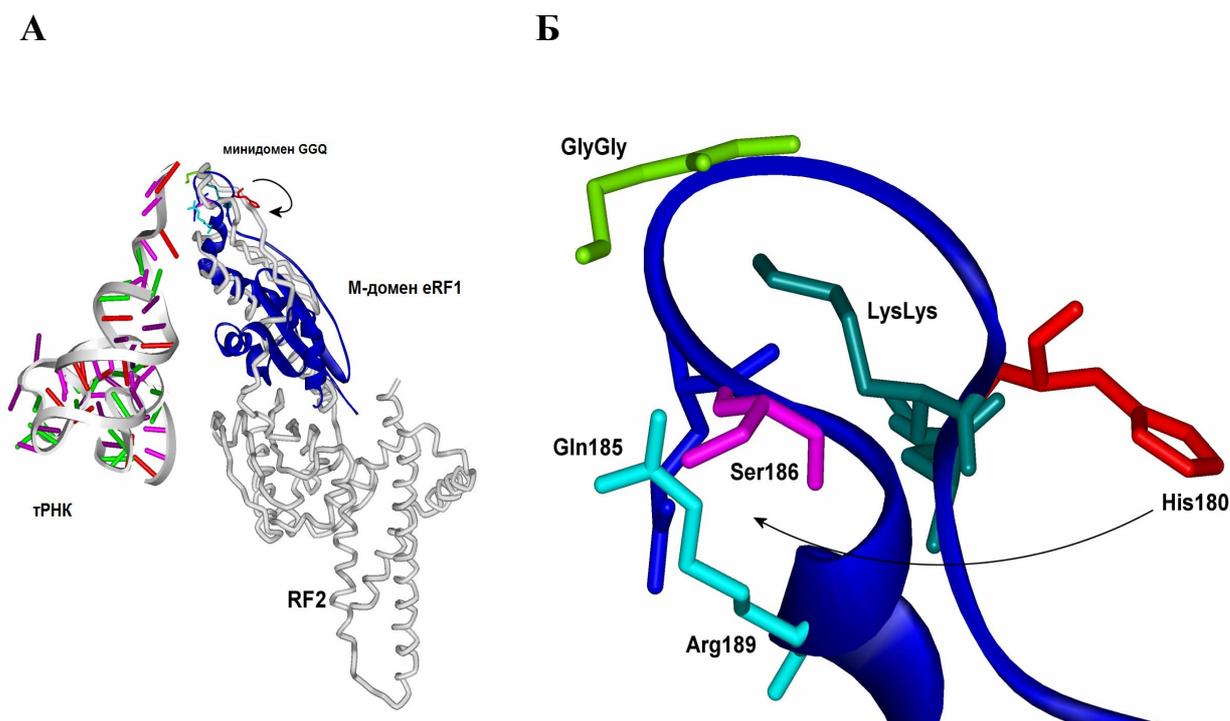
водородная связь формируется между ОН-группой Ser186 и N3-атомом имидазольного кольца His180. Затем происходит атака карбонильной группы субстрата активированным серином. NH<sub>2</sub>-группа Gln185 выступает в качестве электрофила и действует как активатор субстрата. На следующей стадии происходит образование тетраэдрического оксианионного интермедиата (рис бб), после чего происходит нуклеофильная атака сложноэфирной связи между тРНК и пептидилным остатком, активированным атомом кислорода в тетраэдрическом интермедиате. В результате образуется ацилэнзим (рис. бв), который гидролизуется молекулой воды, координируемой, вероятнее всего остатками Gly183 и Gly184. Координируемая двумя остатками глицина молекула воды может активироваться путем формирования водородной связи с His180, за счет чего происходит увеличение ее нуклеофильного потенциала (рис. бг). Активированная молекула воды атакует центральный карбонильный атом сложноэфирной связи в ацилэнзиме, в результате чего образуется второй тетраэдрический интермедиат. Разрыв сложноэфирной связи приводит к высвобождению полипептида, а минидомен GGQ возвращается в свое первоначальное состояние (рис. бд и бе). Данная схема хорошо согласуется с описанными выше результатами по утрате функциональной активности мутантными формами eRF1. Единственным исключением стала мутация Ser186Ala (табл.1), которая не привела к полной потере гидролитической активности. Можно предположить, что в мутанте Ser186Ala функциональную роль Ser186 берет на себя какая-либо другая химическая группа, находящаяся поблизости (например, кислород карбонильной группы основной цепи) либо дополнительная молекула воды, которая может располагаться в полости, образованной вследствие малого размера боковой цепи аланина.



**Рисунок 6.** Предполагаемая схема катализа реакции гидролиза пептидил-тРНК в РТС фактором терминации eRF1.

- (а) Формирование водородной связи между карбонильным атомом кислорода пептидил-тРНК и  $\text{NH}_2$ -группой Gln185 и между  $\text{OH}$ -группой Ser186 и  $\text{N}_3$  атомом His180.
- (б) Формирование тетраэдрического интермедиата между активированным Ser186 и пептидил-тРНК и последующая нуклеофильная атака оксианионом интермедиата сложноэфирной связи между тРНК и пептидом.
- (в) Формирование ацил-энзимного интермедиата и высвобождение тРНК.
- (г) Атака молекулой воды, активированной His180, карбонильной группы ацилэнзима.
- (д) Формирование второго тетраэдрического комплекса.
- (е) Разрыв сложноэфирной связи между пептидом и Ser186 и возвращение минидомена GGQ в исходное состояние.

На рис. 7 представлена суперпозиция полученной нами репрезентативной структуры GGQ-петли М-домена eRF1 человека в растворе и кристаллической структуры петли, содержащей мотив GGQ, бактериального фактора терминации первого класса RF2, связанного с рибосомой. При отсутствии общего структурного сходства между эукариотическим и прокариотическим факторами, положения длинных  $\alpha$ -спиралей и GGQ-петель eRF1 человека и RF2 *E. coli* совпадают.



**Рисунок 7.** Предполагаемая конформация М-домена eRF1 в терминационном комплексе. **А.** Суперпозиция структуры М-домена eRF1 человека в растворе (черный) и кристаллической структуры RF2 *E. coli* (серый) в РТС бактериальной рибосомы (Petry et al., 2005). **Б.** Структура GGQ-петли в каталитически неактивной форме. Показаны боковые цепи аминокислотных остатков, участвующих в гидролизе пептидил-тРНК. Ser186, Gln 185 и Arg189 обращены в сторону нуклеотида А76 пептидил-тРНК, находящейся в Р-участке. His180 отдален от Ser186. Мы предполагаем, что вслед за узнаванием стоп кодона His180 приближается к Ser186 и минидомен GGQ переходит в каталитически активную форму.

Этот факт позволяет предполагать, что конформация GGQ-петли универсальна и механизм гидролиза пептидил-тРНК может оказаться близким в разных царствах живой природы. Более того, определенное сходство присутствует и в первичных структурах бактериального и эукариотического факторов терминации первого класса (рис. 5): в положении 253 прокариотического фактора терминации, соответствующем Ser186 в eRF1, находится в подавляющем большинстве случаев

Ser либо His, а в положении 247, соответствующем His180, – серин. Такая инверсия аминокислотных остатков также допускает механизм, описанный на рис. 6.

Из рис. 7А видно, что Ser186, Gln185 и Arg189 находятся вблизи ССА-3'-конца пептидил-тРНК. Такое расположение облегчает взаимодействия, описанные на рис. 6. Кроме того, Arg189 может принимать участие в корректном позиционировании пептидил-тРНК в РТС. His180 расположен на другом конце GGQ-петли (рис. 7Б) и расстояние между боковыми цепями His180 и Ser186 велико для формирования водородной связи между ними и переноса протона. Однако, изменение ориентации боковых остатков His180 и Ser186 достаточно для их сближения и осуществления предложенного в данной работе механизма. Такое изменение может происходить за счет высокой пластичности и подвижности GGQ-петли, а также вследствие вероятного изменения конформации GGQ-минидомена после передачи терминационного сигнала посредством длинной  $\alpha$ -спирали. Можно предполагать, что eRF1 может находиться в клетке в двух различных конформациях – каталитически активной и неактивной. Переход из каталитически неактивного состояния в активное может происходить после взаимодействия фактора со стоп кодоном в А-участке рибосомы. Существование eRF1 в двух различных состояниях предотвращает не связанный со стоп кодоном гидролиз пептидил-тРНК.

## **ВЫВОДЫ**

1. Определена структура высокого разрешения изолированного среднего (M, middle) домена фактора терминации трансляции первого класса eRF1 человека в растворе. Структура депонирована в Protein DataBank под кодом 2HST. Структура M-домена в растворе имеет достоверные отличия от его кристаллической структуры в полноразмерном eRF1.
2. Обнаружена высокая скорость обмена амидных протонов с водой в петле 177-187 M-домена eRF1, содержащей GGQ-мотив. Мутация G183A не вызывает значительного изменения конформации как петли 177-187, так и белка в целом, но приводит к существенному замедлению обмена амидных протонов в минидомине GGQ.

3. Петля 177-187 М-домена eRF1 претерпевает быстрые движения в шкале времени от пс до нс и медленные конформационные перегруппировки, протекающие в шкале времени от мс и выше. Петля 215-223 также характеризуется как быстрыми (нс), так и относительно медленными (мс) движениями.
4. Установлено, что М-домен eRF1 человека специфично связывается с 60S субъединицей рибосомы эукариот. Аминокислотные остатки белка, формирующие интерфейс взаимодействия с рибосомой, расположены преимущественно вдоль длинной спирали  $\alpha 1$  М-домена. Два других кластера таких аминокислотных остатков располагаются в районе короткой спирали  $\alpha 2$  (остатки 233-235) и на стыке спирали  $\alpha 3$  и листа  $\beta 5$  (остатки 250 и 251). Взаимодействие функционально неактивного мутанта G183A с 60S субчастицей рибосомы оказывается существенно более слабым по сравнению с белком дикого типа и интерфейс такого взаимодействия отличается от М-домена дикого типа.
5. Аминокислотные остатки His180, Gln185 и Ser186 в составе минидомена GGQ играют существенную роль в сохранении активности eRF1 человека. Кроме того, подтверждены более ранние данные о критической роли остатков Gly183 и Gly184 в RF-активности. На связывание фактора с предтерминационным комплексом замены в перечисленных положениях не влияют.
6. Для связывания и способности eRF1 вызывать конформационные перестройки необходимо сохранение положительного заряда в положениях Lys178, Lys179 и Arg189. Замены в данных положениях на нейтральные или отрицательно заряженные аминокислотные остатки вызывают значительное снижение компетентного связывания и, как следствие, нарушение функциональной активности eRF1.
7. Анализ полученных в работе данных позволил предложить модель механизма реакции гидролиза пептидил-тРНК в пептидилтрансферном центре рибосомы эукариот, в которой eRF1 функционирует как гидролаза.