

УДК 577.217.34

Идентификация нового РНК-белкового контакта в комплексе рибосомного белка S7 с 3'-концевым фрагментом 16S рРНК *Escherichia coli*

А. В. Головин¹, Г. А. Хайруллина¹, Б. Крааль³, А. М. Копылов^{2*}¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3³Химический институт Лейденского университета, Лейден, 2300RA, Нидерланды

*E-mail: kopylov.alex@gmail.com

Поступила в редакцию 02.07.2012

РЕФЕРАТ Самосборка 30S малой субчастицы прокариотических рибосом *in vitro* из рРНК и 20 белков происходит иерархически и начинается взаимодействием 16S рРНК с тремя ключевыми белками: S4, S8 и S7. Эти же белки регулируют трансляцию своих оперонов, узнавая мРНК, поэтому изучение РНК-белковых взаимодействий в бинарных комплексах важно для понимания биогенеза рибосом. В представленной работе идентифицирован необычный рРНК-белковый контакт в бинарном комплексе рекомбинантного рибосомного белка S7 со своим участком связывания на фрагменте 16S рРНК *Escherichia coli* (236 нуклеотидов). Методом УФ-индуцируемых РНК-белковых сшивок показано, что белок S7 сшивается с нуклеотидом U1321 16S рРНК. Проведена аннотация опубликованных рРНК-белковых сшивок белка S7 в составе 30S субчастицы *E. coli* в растворе и данных рентгеноструктурного анализа 30S субчастицы. Сшивка, обнаруженная в бинарном комплексе, отличается от сшивок в целой субчастице в растворе, а также от контактов в структуре субчастицы в кристалле. По-видимому, структура бинарного рРНК-белкового комплекса, образующегося в начале сборки малой субчастицы, подвергается перегруппировке в процессе формирования целой субчастицы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рибосома, самосборка, рибосомный белок S7, УФ-индуцируемая сшивка.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PCA – рентгеноструктурный анализ; РНП – рибонуклеопротеид; EcoS7, TthS7, BstS7 – белки S7 *E. coli*, *T. thermophilus* и *B. stearothermophilus* соответственно; Eco16S, Tth16S и Bst16S – фрагменты D3LH 16S рРНК *E. coli*, *T. thermophilus* и *B. stearothermophilus* соответственно; Tth30S и Eco30S – малые субчастицы рибосом *T. thermophilus* и *E. coli* соответственно.

ВВЕДЕНИЕ

Самосборка бактериальных рибосом *in vitro* описана довольно подробно [1–5]. Известна феноменология событий, которые приводят к формированию отдельных субчастиц рибосом, однако детальный анализ взаимодействия рРНК и белков только начинается.

При образовании прокариотических 70S рибосом происходит раздельная сборка двух субчастиц: 30S малой и 50S большой. Малая субчастица рибосом *Escherichia coli* состоит из 16S рРНК длиной 1542 нуклеотида и 20 разных белков среднего размера. Определяющую роль в самосборке 30S субчастицы играют белки, которые первыми связываются с 16S рРНК (S4, S7, S8, S15), что приводит к формированию так называемого «структурного остова» малой

субчастицы [6, 7]. Очередная волна интереса к процессу сборки рибосом была вызвана расшифровкой структуры малой субчастицы термофильных и мезофильных рибосом при помощи рентгеноструктурного анализа (РСА) [8–10]. Появилась возможность описать последовательность событий при самосборке в конкретных структурных терминах [3, 4, 11]. Кроме того, потенциальная возможность вмешаться в процесс биогенеза рибосом может стимулировать создание принципиально новых мощных антибактериальных агентов.

В отличие от 50S субчастицы, экспериментальное изучение самосборки 30S субчастицы облегчается ярко выраженным дискретным характером ее структуры: она состоит из четырех доменов (рис. 1) [8, 9].

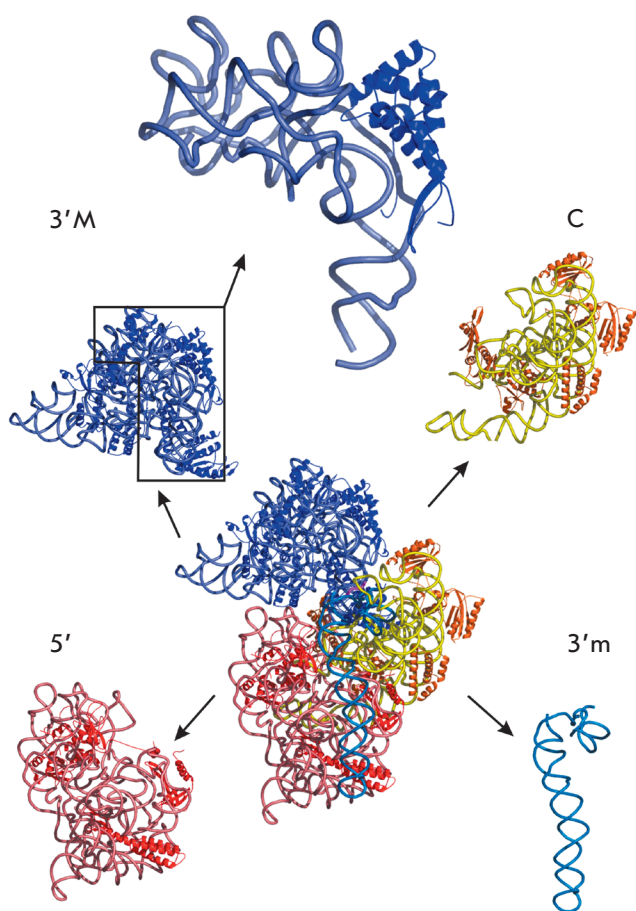


Рис. 1. Структура 30S малой субчастицы рибосом *T. thermophilus* по данным РСА (PDB 1FJF [8]). Обозначения доменов: 5' – 5'-концевой, С – центральный, 3'М – основной 3'-концевой и 3'м – минорный 3'-концевой. Белки изображены темно-синими, оранжевыми и красными лентами, 16S рРНК – светло-синей, голубой, желтой и розовой лентами. Наверху в крупном масштабе показана структура комплекса белка S7 с фрагментом 16S рРНК (Eco16S), экстрагированная *in silico*

Три РНП-домена способны собираться независимо [12–17]. Для основного 3'-концевого домена найден минимальный фрагмент 16S рРНК *E. coli* длиной 236 нуклеотидов (D3LN, Eco16S), способный специфически связываться с ключевым участником сборки субчастицы – белком S7 [18].

Настоящая работа посвящена изучению рРНК-белковых контактов в бинарном комплексе рекомбинантного рибосомного (р-) белка S7 с участком связывания на фрагменте 16S рРНК *E. coli* с использованием УФ-индуцированных РНК-белковых сшивок. Идентифицирован необычный рРНК-белковый

контакт – белок S7 сшивается с нуклеотидом U1321. Проведена аннотация опубликованных ранее рРНК-белковых сшивок белка S7 в 30S субчастице в растворе и данных РСА для кристалла малой субчастицы. Обнаруженная нами новая рРНК-белковая сшивка в бинарном комплексе не совпадает с аннотированными сшивками в целой субчастице. Можно предположить, что структура бинарного рРНК-белкового комплекса, образующегося на начальных этапах сборки малой субчастицы рибосом, должна подвергаться перестройке при образовании целой субчастицы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы полинуклеотидкиназа фага T4 (PNK) и буфер для PNK («New England Biolabs», США), обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (RT-AMV), ДНК-полимераза Taq, ингибитор РНКаз, протеиназа К, нуклеозидтрифосфаты и их дидезоксипроизводные («Roche», Германия), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ («Amersham», Германия), бычий сывороточный альбумин (BSA, MBI, «Fermentas», Литва), нитроцеллюлозные фильтры 0.45 мкм («Millipore NA», США; «Schleicher & Schuell» BA85, Германия), Ni-NTA-агароза («QIAGEN», Германия), фенолметилсульфонилфторид (PMSF, «Merck», Германия). Плазмида рFD3LN любезно предоставлена Л. Браки-Жингра (Монреальский университет, Канада).

Буфер А: 50 мМ Трис-НСl (рН 9.5), 1.5 мМ MgCl_2 , 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 мМ дитиотреитол (DTT), 0.005% NP-40, 5% диметилсульфоксид (DMSO), 1 мМ бетаин. Буфер Б: 40 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 12 мМ MgCl_2 , 10 мМ NaCl, 10 мМ DTT, 2 мМ спермидин. Буфер В: 0.3 М NaAc (рН 5.2), 1 мМ EDTA, 0.2% фенол. Буфер Г: 50 мМ Hepes-КОH (рН 7.0), 100 мМ KCl. Буфер Д: 50 мМ Трис-НСl (рН 8.5), 10 мМ MgCl_2 , 60 мМ KCl, 10 мМ DTT, 0.5 мМ dNTP. Буфер Е: 20 мМ Трис-Ас (рН 7.8), 7 мМ MgAc_2 , 300 мМ NH_4Cl , 0.2% BSA.

Выделение рекомбинантных белков S7 *E. coli* (EcoS7) и S7 *Thermus thermophilus* (TthS7) из суперпродуцентов *E. coli*

EcoS7 выделяли из суперпродуцента *E. coli* по протоколам фирмы «QIAGEN» как кратко описано ранее [19]. Клетки собирали центрифугированием, суспендировали в 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), содержащем 500 мМ NaCl и лизоцим. После инкубации добавляли глицерин до 10%, меркаптоэтанол до 5 мМ, PMSF до 0.5 мМ и Тритон X-100 до 1%. После обработки ультразвуком тельца включения растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, наносили на Ni-NTA-агарозу и после промывки концентрацию мочевины в элюенте понижали до нуля. Белок элюировали градиентом раствора имидазола 0–0.5 М в буфере 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 500 мМ NaCl, 1 мМ меркаптоэта-

нол, 5% глицерин, 0.5 мМ PMSF. Белок переводили диализом в буфер 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 0.2 мМ DTT, 5% глицерин, 0.5 мМ PMSF и хранили при -70°C. Перед комплексообразованием белок переводили в буфер 20 мМ Трис-HCl (pH 7.6), 4 мМ MgAc₂, 400 мМ NH₄Cl, 0.2 мМ EDTA, 4 мМ меркаптоэтанол. Белок TthS7 выделяли таким же образом [19, 20].

Амплификация ДНК с помощью ПЦР

Фрагмент матричной ДНК амплифицировали с плазмиды rFD3LH, которая содержала кДНК минимального фрагмента 16S рРНК под контролем промотора фага Т7. ПЦР проводили в 50–400 мкл буфера А, содержащего 200 мМ dNTP, 20 пмоль праймеров, от 50 до 500 нг rFD3LH, 2–5 ед. акт. ДНК-полимеразы Taq. 5'-Концевой праймер AGGGATCСТААТАСГАСТСАСТАТАGГG соответствует промоторной последовательности РНК-полимеразы фага Т7 и комплементарен векторной последовательности; 3'-концевой праймер GTAAGCTTACAAGGCCCGGGAACGТАТТCACC комплементарен фрагменту G1370 –U1393 Eco16S (некомплементарная последовательность подчеркнута). Праймеры синтезированы фирмой «MWG-Biotech AG», Германия. ПЦР проводили в термоциклере («BioRad», США) в следующих условиях: предварительная инкубация – 95°C, 2 мин; цикл – 95°C, 45 с; 60°C, 30 с; 72°C, 30–60 с. После 25 циклов дополнительно инкубировали при 72°C в течение 4 мин. ДНК очищали электрофорезом в 1–2% агарозном геле, экстракцией тремя объемами (по массе геля) 6 М NaI (56°C, 5 мин) с последующей очисткой при помощи PCR Purification Kit («Roche», Германия).

Транскрипция фрагмента 16S рРНК (Eco16S) *in vitro*

Транскрипцию Eco16S проводили на ПЦР-копии матричной ДНК, содержащей промотор РНК-полимеразы фага Т7, в 100 мкл раствора следующего состава: 2.5 мМ NTP, 1000 ед. акт. РНК-полимеразы фага Т7, 60 ед. акт. ингибитора РНКаз, 1 мкг/мл пирофосфатазы, 4 мкг матрицы ДНК, в буфере Б при 37°C в течение 4 ч. После транскрипции раствор подвергли фенольной депротеинизации с последующей экстракцией хлороформом и осаждением этанолом. РНК очищали в 8% ПААГ с 7 М мочевиной и элюировали диффузией из геля в буфере В. После элюции РНК обрабатывали фенолом, хлороформом и осаждали этанолом. Осадок РНК растворяли в 50 мкл воды, целостность РНК проверяли электрофорезом в 8% ПААГ с 7 М мочевиной. Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм: 1 мг РНК – 22 о.е.

Получение комплексов EcoS7–Eco16S и TthS7–Eco16S

Комплексообразование проводили в 200 мкл буфера Е. РНК и белок ренатурировали отдельно при 37°C в течение 30 мин, смешивали и прогревали (37°C, 30 мин). Степень образования комплексов определяли сорбцией на нитроцеллюлозных мембранах при скорости фильтрации 0.5 мл/мин, титруя постоянное количество меченной ³²P РНК возрастающим количеством белка [19]. Радиоактивность фильтров определяли в 10 мл воды по Черенкову на счетчике Tracor Analytic (Франция). Кажущуюся константу диссоциации (aK_d) рассчитывали с помощью программы XMGRACE, GNU (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>), используя следующее уравнение:

$$\alpha = \frac{P_0}{K_d * R_0 + R_0^2 + P_0 R_0},$$

где P_0 – концентрация белка S7, R_0 – фиксированная концентрация Eco16S, K_d^* (aK_d) – кажущаяся константа диссоциации, α – доля связанной в комплексе Eco16S.

УФ-индуцированная ковалентная РНК-белковая сшивка в комплексах EcoS7–Eco16S и TthS7–Eco16S

Комплексообразование проводили в 200 мкл буфера Е при концентрации РНК 150 нМ и 10-кратном мольном избытке белка. Белок ренатурировали при 37°C, смешивали с РНК и прогревали при 37°C в течение 30 мин. Комплекс в течение 10 мин облучали УФ-светом при 260 нм («Stratolinker», США, мощность 2400 мкВ) во льду с источником, удаленным на 15 см. Интенсивность облучения контролировали уридинометрией.

Получение меченных ³²P по 5'-концу олигодезоксирибонуклеотидных праймеров

Меченый праймер (3'-концевой праймер для ПЦР) для обратной транскрипции получали кинированием РНК в присутствии [γ -³²P]АТФ. РНК-буфер (10 мкл), содержащий 20 пмоль праймера, 3 мкл [γ -³²P]АТФ (0.4 МБк/мкл), 10 ед. акт. РНК, инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 90 мкл 0.3 М NaAc (pH 5.2) с последующей фенольной депротеинизацией и экстракцией хлороформом. Праймер осаждали этанолом и растворяли в 40 мкл воды.

Картирование нуклеотида Eco16S, сшитого с белком S7, в комплексах EcoS7–Eco16S и TthS7–Eco16S

После облучения комплекс обрабатывали протеиназой К для удаления белка S7. Нуклеотид Eco16S,

сшитый с белком S7, картировали при помощи обратной транскрипции, используя меченный по 5'-концу праймер. Гибридизацию праймера с РНК проводили в 4.5 мкл буфера Г, содержащего 2–5 пмоль РНК и 0.5 пмоль праймера. РНК денатурировали при 95°C в течение 1 мин с последующим медленным охлаждением до 42.5°C. Обратную транскрипцию проводили в 8.5 мкл буфера Д, содержащего 2.2 ед. акт. RT-AMV при той же температуре в течение 1 ч. В контрольном

секвенировании добавляли 70–400 мкМ одного из ddNTP. Образцы анализировали в 8% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известная на настоящий момент пространственная структура 30S малой субчастицы рибосом получена как для термофильных бактерий *T. thermophilus* (Tth30S) методом PCA [8, 9], так и для *E. coli* [10]. Биохимических данных, описывающих сборку 30S субчастицы *T. thermophilus* в растворе, не существует, установлена только возможность доменной сборки [14, 15, 17]. Основная масса биохимических данных по самосборке рибосом получена на рибосомах *E. coli*. В связи с этим безусловный интерес представляет анализ корреляции биохимических данных, полученных для Eco30S в растворе, и данных PCA для Eco30S и Tth30S.

РНК-белковые шивки широко использовались для изучения контактов в 30S субчастице бактериальных рибосом в растворе. Описано несколько шивок 16S рРНК и белка S7 в составе 30S субчастицы *E. coli* (таблица). Две такие характерные шивки идентифицированы достоверно – это U1240–Met115 и C1378–Lys75, что хорошо коррелирует с данными PCA кристаллов (таблица, рис. 2). Поэтому в настоящей работе мы использовали УФ-индуцируемое сшивание для идентификации возможных рРНК-белковых контактов в бинарном комплексе фрагмента Eco16S с белком S7. Ранее было показано, что комплекс белка S7 с целой 16S рРНК при УФ-облучении образует шивку [32], однако, сшиваемые остатки не были установлены.

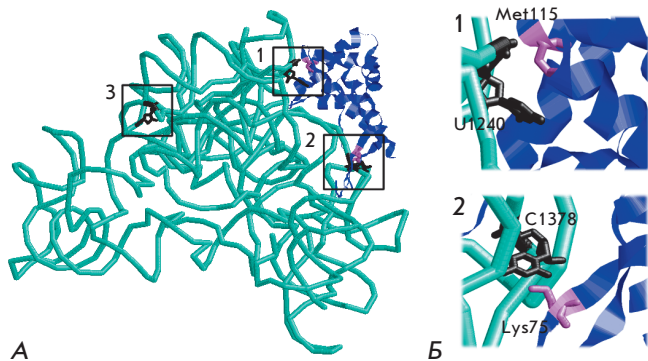


Рис. 2. Корреляция данных PCA 30S субчастицы *E. coli* в кристалле и данных по шивкам этой субчастицы в растворе. А – Структура комплекса EcoS7–Eco16S, экстрагированная *in silico* из Eco30S. Голубая лента – Eco16S, синяя лента – белок S7. Рамками обозначены РНК-белковые шивки: 1 – U1240–Met115; 2 – C1378–Lys75; 3 – U1321–белок S7 в бинарном комплексе, данная работа (таблица). Б – Увеличенное изображение рРНК-белковых контактов рис. 2А

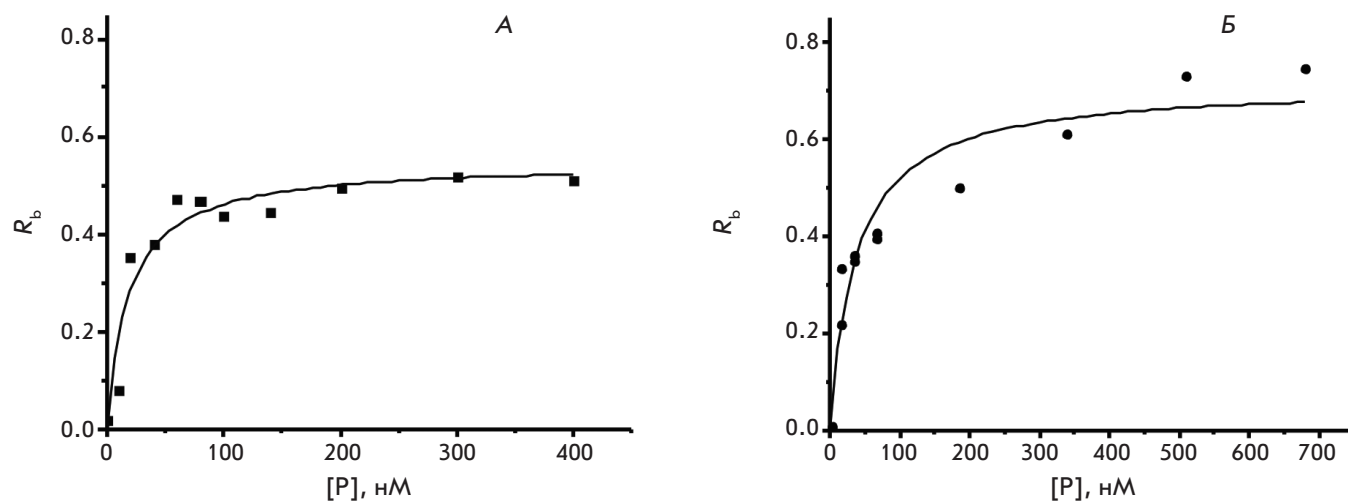


Рис. 3. Изотермы связывания для комплексов EcoS7–Eco16S (А) и TthS7–Eco16S (Б). $aK_d = 21.5 \pm 1.9$ и 35.8 ± 9.3 нМ соответственно. Исходная концентрация Eco16S – 20 нМ, [P] – концентрация белка, R_b – доля связанной с белком Eco16S

Анализ корреляции данных РСА 30S субчастицы рибосом *E. coli* и данных по сшивкам 16S рРНК–белок S7 в 30S субчастице в растворе

№	Сшивка с 16S рРНК	Сшивка с белком S7	Расстояние в Eco30S, Å	Реагент	Размер реагента, Å	Ссылка
1.1	A1238–U1240	S7	3.0	АФИ	8.6	[21]
1.2	A1238–U1240	S7	3.0	ИТ	5	[22]
1.3*	U1240	M115**	2.7	ИТ	5	[23–25]
1.4	U1240***	S7	2.7	УФ	0	[26]
1.5	16S рРНК	M115**	2.7	УФ	0	[27]
2.1	A1377–C1378	S7	3.8	ИТ	5	[22]
2.2	C1378	K75	3.8	ИТ	5	[25]

Примечания. Нумерация в первом столбце: первая цифра обозначает номер контакта – 1 (1238–1240) или 2 (1377–1378), вторая цифра – порядковый номер сшивки: 1–5 для первого контакта, 1–2 для второго. АФИ – метил-*p*-азидофенилацетимидат; ИТ – 2-иминотиолан.

*Аналогичная сшивка идентифицирована в малой субчастице *Bacillus stearothermophilus* (Met115 Bst7) [24, 27].

**В работах [23–25, 27] Met115 обозначается как Met114 (ошибка в секвенировании белка EcoS7 [28], пропущен R91 [29]).

***До 1979 г. использовали ошибочную нумерацию 16S рРНК [30] (U1239 вместо U1240).

Данные, не включенные в таблицу. А) 30S субчастица *E. coli*. 1. Идентифицирована сшивка C1265 16S рРНК с белком S7 [30]. C1265 находится на расстоянии 35 Å от ближайшего аминокислотного остатка белка S7 в Eco30S. 2. Идентифицированы сшивки 278–280, 1139–1144, 1155–1158, 1531–1542 16S рРНК с белком S7 [31]. Минимальное расстояние между районом 1531–1542 16S рРНК и белком S7 в Eco30S составляет 11 Å. Б) 30S субчастица *B. stearothermophilus*: идентифицирована сшивка 16S рРНК с Lys8 белка S7 [27].

Как показала Браки-Жингра и соавт. [18] белок EcoS7 способен связываться с небольшим фрагментом 16S рРНК (236 нуклеотидов, D3LH, Eco16S) – узловым элементом структуры основного 3'-концевого домена 16S рРНК. Комплекс EcoS7 и Eco16S авторы получали с использованием EcoS7, выделенного стандартным методом из суммарного белка рибосом [33]. Кажущаяся константа диссоциации комплекса (aK_d) такого белка была довольно высокой – 620 ± 80 нМ [18]. В дальнейшем использовали рекомбинантный белок, содержащий шесть дополнительных остатков гистидина (6 His) на N-конце. Рекомбинантный белок также связывался с Eco16S, его aK_d была гораздо меньше в диапазоне 110–210 нМ [34, 35]. Как полагают, дополнительный фрагмент, содержащий 6 His, не влияет на связывание белка с 16S рРНК [35], а различие в константах отражает разницу в методах выделения. В настоящей работе был использован рекомбинантный белок EcoS7, который имел N-концевые 6 His [19]. Комплекс EcoS7 с Eco16S оказался более стабильным, чем считалось [34, 35], а его aK_d составляла 21.5 ± 1.9 нМ (рис. 3), что свидетельствует о высокой активности.

Комплекс EcoS7–Eco16S облучали УФ-излучением, эффективность сшивки оценивали электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях по соотношению радиоактивности в зоне РНП к суммарной радиоактивности рРНК. Время облучения выбирали при максимальном значении выхода сшитого РНП. Для идентификации контакта Eco16S с EcoS7 положение сшитых с белком гетероциклических оснований рРНК определяли с помощью обратной транскрипции после гидролиза белка протеиназой K, принимая во внимание, что обратная транскриптаза останавливается за один нуклеотид до модифицированного. Анализ «сшитого» комплекса Eco16S с EcoS7 (рис. 4, дорожка 2) однозначно выявляет уникальный стоп-сигнал, соответствующий нуклеотиду C1322 (сшивка с U1321). В остальных местах дополнительных «стопов» не обнаружено. Положение сшивки показано на третичной структуре 30S субчастицы рибосом *E. coli* (рис. 2).

Идентифицированный контакт Eco16S рРНК с белком EcoS7 отличается от уже известных контактов, образующихся при сшивании 16S рРНК с белком S7 в малой субчастице рибосом *E. coli* в растворе (*ma-*

блица). Более того, найденный нами контакт Eсo16S с белком EсoS7 не соответствует и структуре аналогичного РНП-домена в составе 30S субчастицы *E. coli* в кристалле (рис. 2): ближайший к U1321 аминокислотный остаток белка S7 расположен на расстоянии 35 Å (таблица).

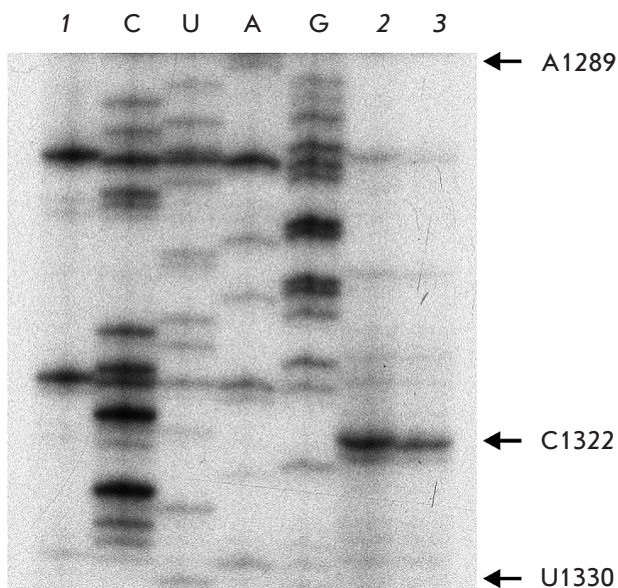


Рис. 4. Анализ сшивки EсoS7 и TthS7 с Eсo16S в бинарных комплексах. Фрагмент радиоавтографа электрофореза в 8% ПААГ с 8 М мочевиной продуктов обратной транскрипции Eсo16S с праймера. 1 – кДНК с Eсo16S рРНК после УФ-облучения. С, U, А, G – продукты секвенирования Eсo16S рРНК (A1289–U1330). 2, 3 – Анализ УФ-облученных комплексов Eсo16S рРНК с белками EсoS7 и TthS7 соответственно. Стрелкой указана зона, соответствующая C1322 (сшивка с U1321)

Найденное различие можно объяснить тем, что при взаимодействии белка S7 с 16S рРНК на начальных этапах самосборки рибосомы структура образуемого бинарного комплекса отличается от конечной структуры соответствующего РНП-домена в составе субчастицы. Исходя из анализа структуры РНП-домена в структуре Eсo16S и Tth30S, можно предположить, что для Eсo16S в бинарном комплексе с белком S7 скорее всего характерно развернутое состояние пучка из четырех спиралей (H30, H41, H42, H43), которые в кристаллической структуре Eсo16S и Tth30S упакованы вместе бок о бок [19]. Вероятно, для стабилизации бинарного комплекса в компактном состоянии при самосборке рибосом требуются дополнительные факторы, например, локально высокая концентрация ионов магния [19] или взаимодействие с другими белками домена. Это предположение согласуется с наличием у термофильных рибосом дополнительного особого белка Tth, который имеет сильно основной характер и, таким образом, может стабилизировать компактную структуру этого РНП-домена [8, 9].

Безусловный интерес представляет сравнительное изучение структуры гетерологичного комплекса белка TthS7 с Eсo16S. В данном случае белок TthS7 может рассматриваться как «природный мутант» белка EсoS7 [19]. Как показано нами ранее [19, 36], TthS7 может образовывать стабильные комплексы с Eсo16S. В данной работе гетерологичный комплекс имел aK_d 35.8 ± 9.3 нМ (рис. 3), что сравнимо с aK_d гомологичного комплекса EсoS7–Eсo16S ($aK_d = 21.5 \pm 1.9$ нМ). Места контакта рекомбинантного TthS7 с фрагментом Eсo16S идентифицировали так же, как и в случае комплекса Eсo16S с EсoS7: с белком TthS7 сшивается U1321 (рис. 4). По-видимому, в гетерологичном комплексе существует похожий РНК-белковый контакт. Интересно, что позиция 1321 в 16S рРНК очень консервативна филогенетически, и замена выявлена только у термофильных 16S рРНК (рис. 5).

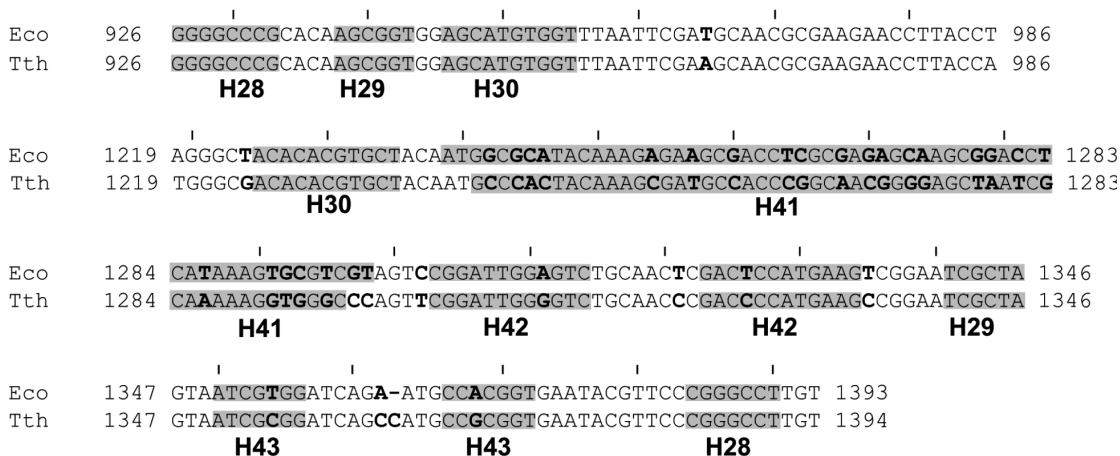


Рис. 5. Сравнение первичных структур фрагментов Eсo16S и Tth16S. Нумерация нуклеотидов в Eсo16S стандартная, в Tth16S – согласно PDB 1FJF [12] для Tth30S. Жирным выделены неидентичные нуклеотиды. Двухтяжевые участки выделены серым

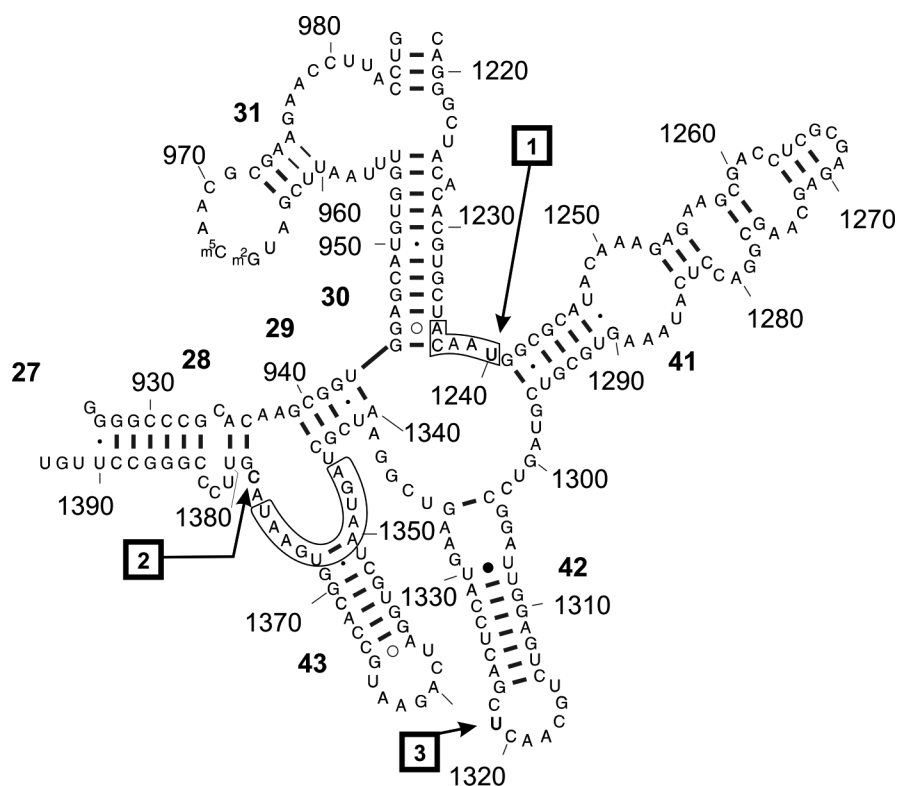


Рис. 6. Модель вторичной структуры фрагмента основного 3'-концевого домена 16S рРНК (D3LH, E. coli 16S), использованного в данной работе [18]. РНК-белковые сшивки указаны стрелками. Данные по сшивкам взяты из таблицы. Для 30S субчастицы рибосом *E. coli*: 1 – сшивка U1240–M115; 2 – сшивка C1378–K75. Для бинарного комплекса: 3 – сшивка U1321–белок S7, идентифицированная в нашей работе. В рамках показаны участки 16S рРНК, идентичные участку связывания S7 на стрептомициновой мРНК [30]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что для изучения первых этапов сборки малой субчастицы рибосом бактерий можно получать бинарные комплексы рибосомного белка S7 с его локальным участком связывания на 16S рРНК. Такая возможность хорошо согласуется с показанной ранее возможностью сборки отдельных доменных РНП-комплексов бактериальных рибосом [5, 37]. При УФ-облучении бинарных комплексов (260 нм) как в гомологичном (EcoS7–Eco16S), так и в гетерологичном (TthS7–Eco16S) комплексе с белком S7 сшивается остаток U1321. Как результат поиска сходных структур в 16S рРНК и мРНК Сайто и Номура [38] предположили, что рекомбинантный белок S7 узнает определенный мотив в структуре 16 рРНК, расположенный рядом с обнаруженной сшивкой (рис. 6). Более того, идентифицирована сшивка белка S7 с фрагментом мРНК рядом с предполагаемым мотивом [39]. Совокупность этих данных говорит

в пользу предположения Сайто и Номуры [38] о возможности первичного узнавания белком S7 данного мотива РНК.

Можно предположить, что формирование целой малой субчастицы рибосом приводит к реорганизации контактов в первоначальном бинарном комплексе. Подобная перегруппировка наблюдается и в других РНК-белковых комплексах; например, в комплексах тРНК с фенилаланин-тРНК-синтетазой [40]. Интересные перегруппировки обнаружены и при диссоциации бинарных РНК-белковых комплексов [41]. ●

Авторы благодарят А.А. Богданова, Ю. Брозиуса, Т.И. Рассохина, Т.С. Рождественского, В.А. Спиридонову за интерес, полезные дискуссии и поддержку.

Работа поддержана DAAD, РФФИ (грант № 11-04-01990-а), РФФИ-НВО (гранты № 03-04-89001, 047.015.018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spirin A.S. // Ribosomes / Ed. Siekevitz P. N.Y.: Kluwer Acad./Plenum Publ., 1999. P. 98–101.
2. Nomura M. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 6857–6864.
3. Culver G.M. // Biopolymers. 2003. V. 68. P. 234–249.
4. Williamson J.R. // RNA. 2003. V. 9. P. 165–167.
5. Mulder A.M., Yoshioka C., Beck A.H., Bunner A.E., Milligan R.A., Potter C.S., Carragher B., Williamson J.R. // Science.

2010. V. 330. № 6004. P. 673–677.
6. Bogdanov A.A., Kopylov A.M., Shatsky I.N. // Subcell. Biochem. 1980. V. 7. P. 81–116.
7. Nowotny V., Nierhaus K.H. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 7051–7055.
8. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vornrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V. // Nature. 2000. V. 407. P. 327–339.

9. Schlutzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A. // *Cell*. 2000. V. 102. P. 615–623.
10. Dunkle J.A., Xiong L., Mankin A.S., Cate J.H.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 17152–17157.
11. Копылов А.М. // *Биохимия*. 2002. Т. 67. С. 372–382.
12. Weitzmann C.J., Cunningham P.R., Nurse K., Ofengand J. // *FASEB J*. 1993. V. 7. P. 177–180.
13. Samaha R.R., O'Brien B., O'Brien T.W., Noller H.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 7884–7888.
14. Agalarov S.C., Selivanova O.M., Zheleznyakova E.N., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I., Spirin A.S. // *Eur. J. Biochem*. 1999. V. 266. P. 533–537.
15. Agalarov S.C., Zheleznyakova E.N., Selivanova O.M., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I., Vasiliev V.D., Spirin A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 999–1003.
16. Jagannathan I., Culver G.M. // *J. Mol. Biol*. 2003. V. 330. P. 373–383.
17. Serdyuk I., Ulitin A., Kolesnikov I., Vasiliev V., Aksenov V., Zaccai G., Svergun D., Kozin M., Willumeit R. // *J. Mol. Biol*. 1999. V. 292. P. 633–639.
18. Dragon F., Brakier-Gingras L. // *Nucl. Acids Res*. 1993. V. 21. P. 1199–1203.
19. Рассохин Т.И., Головин А.В., Петрова Е.В., Спиридонова В.А., Каргинова О.А., Рождественский Т.С., Брозис Ю., Копылов А.М. // *Молекуляр. биология*. 2001. Т. 35. С. 617–627.
20. Karginov A.V., Karginova O.A., Spiridonova V.A., Kopylov A.M. // *FEBS Lett*. 1995. V. 369. P. 158–160.
21. Osswald M., Greuer B., Brimacombe R., Stoffler G., Baumert H., Fasold H. // *Nucl. Acids Res*. 1987. V. 15. P. 3221–3240.
22. Wower I., Brimacombe R. // *Nucl. Acids Res*. 1983. V. 11. P. 1419–1437.
23. Urlaub H., Thiede B., Muller E.C., Wittmann-Liebold B. // *J. Protein Chem*. 1997. V. 16. P. 375–383.
24. Urlaub H., Krufft V., Wittmann-Liebold B. *Methods in Protein Structure Analysis*. N.Y.: Plenum Press, 1995. P. 275–282.
25. Urlaub H., Thiede B., Muller E.C., Brimacombe R., Wittmann-Liebold B. // *J. Biol. Chem*. 1997. V. 272. P. 14547–14555.
26. Zwieb C., Brimacombe R. // *Nucl. Acids Res*. 1979. V. 6. P. 1775–1790.
27. Urlaub H., Krufft V., Bischof O., Muller E.C., Wittmann-Liebold B. // *EMBO J*. 1995. V. 14. P. 4578–4588.
28. Reinbolt J., Tritsch D. // *FEBS Lett*. 1978. V. 91. P. 297–301.
29. Johanson U., Hughes D. // *Gene*. 1992. V. 120. P. 93–98.
30. Ehresmann B., Backendorf C., Ehresmann C., Millon R., Ebel J.P. // *Eur. J. Biochem*. 1980. V. 104. P. 255–262.
31. Greuer B., Osswald M., Brimacombe R., Stoffler G. // *Nucl. Acids Res*. 1987. V. 15. P. 3241–3255.
32. Ehresmann B., Reinbolt J., Backendorf C., Tritsch D., Ebel J. // *FEBS Lett*. 1976. V. 67. P. 316–319.
33. Wittmann H.G. *Ribosomes*. Cold Spring Harbor: CSHL, 1974. P. 93–114.
34. Robert F., Brakier-Gingras L. // *Nucl. Acids Res*. 2001. V. 29. P. 677–682.
35. Robert F., Gagnon M., Sans D., Michnick S., Brakier-Gingras L. // *RNA*. 2000. V. 6. P. 1649–1659.
36. Spiridonova V.A., Golovin A.V., Drygin D.Yu., Kopylov A.M. // *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1998. V. 44. P. 1141–1146.
37. Agalarov S.C., Selivanova O.M., Zheleznyakova E.N., Zheleznaya L.A., Matvienko N.I., Spirin A.S. // *Eur. J. Biochem*. 1999. V. 266. № 2. P. 533–537.
38. Saito K., Nomura M. // *J. Mol. Biol*. 1994. V. 235. № 1. P. 125–139.
39. Golovin A., Spiridonova V., Kopylov A. // *FEBS Lett*. 2006. V. 580. № 25. P. 5858–5862.
40. Klipcan L., Moor N., Finarov I., Kessler N., Sukhanova N., Safro M.G. // *J. Mol. Biol*. 2012. V. 415. № 3. P. 527–537.
41. Anunciado D., Dhar A., Gruebele M., Baranger A.M. // *J. Mol. Biol*. 2011. V. 408. P. № 5. P. 896–908.