

*На правах рукописи*

ХАЙРУЛИНА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

**СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ БЕЛКОВ rpS15e И eRF1,  
СОСЕДСТВУЮЩИЕ С мРНК В ДЕКОДИРУЮЩЕМ ЦЕНТРЕ  
РИБОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

Научный руководитель: д.х.н., профессор Карпова Галина Георгиевна

Официальные оппоненты: д.х.н. Сергиев Петр Владимирович  
д.б.н., доцент Бунева Валентина Николаевна

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г. в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01  
при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Синтез белков на рибосоме является одним из ключевых процессов жизнедеятельности каждой клетки. Рибосомы прокариот на сегодняшний день детально изучены с применением различных методов, но наиболее впечатляющие успехи были достигнуты на рубеже веков благодаря достижениям рентгеноструктурного анализа (РСА), которые позволили расшифровать структуру рибосом прокариот на уровне отдельных атомов. Однако метод РСА до сих пор не применен для изучения комплексов рибосом высших эукариот с мРНК и тРНК, поскольку их кристаллы, пригодные для такого анализа, еще не получены. Несмотря на значительные успехи в изучении строения рибосом эукариот с помощью метода крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ), этот метод пока не удалось в полной мере применить для изучения структурно-функциональной организации рибосом высших эукариот. Наконец, для исследования рибосом эукариот неприменимы методы, основанные на реконструкции рибосомных субчастиц из белков и рРНК, поскольку пока не найдено подходов для сборки активных рибосомных субчастиц эукариот *in vitro*. Одним из наиболее информативных методов для изучения структурно-функциональной топографии трансляционных комплексов рибосом эукариот и, в частности человека, оказался метод аффинного химического сшивания (аффинной модификации). Этот метод основан на использовании аналогов компонентов аппарата трансляции, несущих химически активную группу в заданном положении. С использованием аналогов мРНК – производных олигорибонуклеотидов в ЛСФР ИХБФМ СО РАН изучен на уровне белков и нуклеотидов рРНК мРНК-связывающий центр рибосомы человека. Полученные результаты показали, что у высших эукариот белки вносят больший вклад в организацию мРНК-связывающего центра рибосомы, чем у эубактерий, и позволили выявить значительные различия в белковом окружении мРНК на рибосомах млекопитающих и эубактерий. В частности, в декодирующем центре рибосомы человека был обнаружен рибосомный белок S15 (rpS15e) (Graifer et al., 2004), чей прокариотический гомолог rpS19p, по данным РСА, удален от этого центра в 30S субчастице. Однако к моменту начала настоящей работы оставалось неизвестным, какие фрагменты rpS15e вовлечены в формирование декодирующего центра рибосомы человека. Метод аффинной модификации является также наиболее подходящим методом для изучения молекулярных основ декодирования стоп-сигнала на рибосомах высших эукариот, осуществляемого с помощью фактора терминации трансляции eRF1 (от англ. eukaryotic release factor class 1). К настоящему времени накоплены данные об аминокислотных остатках eRF1, замена которых приводит к нарушению узнавания стоп-кодона (Bertram et al., 2000, Hatin et al., 2010). С помощью метода аффинной модификации удалось определить фрагмент фактора, контактирующий с первым уридином стоп-кодона в терминационном комплексе (Chavatte et al., 2002). Данных о фрагментах eRF1, формирующих участок узнавания пуринов стоп-сигнала, к моменту начала настоящей работы не было.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось установление фрагментов gpS15e и eRF1, соседствующих с мРНК в декодирующем центре рибосомы человека, с помощью аффинной модификации данных белков аналогами мРНК – производными олигорибонуклеотидов, несущими фотоактивируемую группу в заданном положении, в составе различных модельных комплексов рибосом с этими аналогами. Невысокий выход продуктов сшивки при аффинной модификации белков в составе таких комплексов затрудняет идентификацию модифицированных олигопептидов с помощью масс-спектрометрии. Этим трудностям можно избежать при использовании методологии, основанной на селективном расщеплении белка, сшитого с меченым аналогом мРНК, специфическими протеолитическими агентами.

В ходе работы планировалось решить следующие задачи:

- определить фрагменты gpS15e, сшивающиеся с аналогами мРНК, несущими перфторфенилазидобензильную группу на остатке уридина или гуанозина, в модельных комплексах 80S рибосом, различающихся по типу кодона в А-участке и положению модифицированного нуклеотида относительно кодона в Р-участке, а также по наличию фактора терминации трансляции eRF1;
- с использованием аналогов мРНК, несущих перфторфенилазидобензильную группу на остатках уридина, гуанозина или аденозина в разных положениях стоп-сигнала, либо на 3'-концевом фосфате, определить аминокислотные остатки eRF1, сшивающиеся с модифицированными нуклеотидами этих аналогов в терминационных комплексах 80S рибосом.

**Научная новизна и практическая ценность.** В настоящей работе представлены новые данные о структурно-функциональной организации комплексов 80S рибосом с различными лигандами, полученные с помощью метода аффинной модификации. В ней использован уникальный набор аналогов мРНК – производных олигорибонуклеотидов, несущих перфторфенилазидогруппу на нуклеотиде в заданном положении. Продемонстрирована результативность метода аффинной модификации в сочетании с методологией, основанной на специфическом расщеплении модифицированных белков, для определения олигопептидов, сшивающихся с аналогами мРНК в составе специфических комплексов 80S рибосом. В рамках настоящего исследования, получены данные о тонкой структуре декодирующего центра рибосомы человека на уровне декапептида 131-PGIGATHSSR-140 gpS15e, соседствующего с кодоном мРНК в А-участке рибосомы, и о фрагментах eRF1, сближенных со стоп-кодоном и нуклеотидом, прилегающим к нему с 3'-стороны. Полученные результаты имеют принципиальное значение для понимания молекулярных основ функционирования трансляционных комплексов 80S рибосом и дают новое представление о механизмах распознавания остатков гуанина и аденина в терминирующих тетраплеттах, объясняющее способность eRF1 распознавать все три стоп-кодона.

**Апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы. Результаты работы были представлены на следующих международных и

российских конференциях: IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), 33<sup>rd</sup> FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference «Biochemistry of Cell Regulation» (Athens, Greece, 2008), ARCUS Workshop «Development of new tools for fundamental research in health and disease» (Страсбург, 2008), IV Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Казань, 2009), First Symposium Supramolecular Chemistry for Materials and Life Science (Novosibirsk, 2010), V Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Петрозаводск, 2011), международной конференции «Физико-химическая биология», посвящённой 85-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, 2011).

**Личный вклад автора.** В диссертационную работу включены материалы исследований, выполненных автором лично.

**Структура работы.** Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы и содержит 5 таблицы и 36 рисунков.

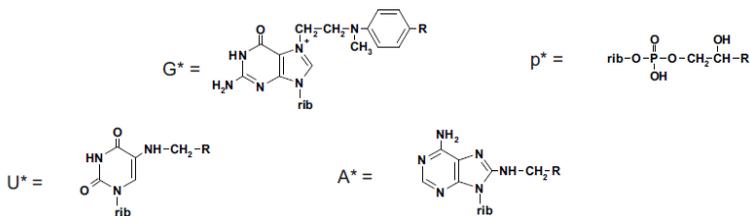
## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В настоящей работе определены фрагменты *gpS15e* и *eRF1*, соседствующие с кодоном мРНК в А-участке рибосомы человека. Для этого использована методология, основанная на селективном расщеплении белков, модифицированных мечеными аналогами мРНК – производными олигорибонуклеотидов в составе различных модельных комплексов 80S рибосом, с последующим анализом образующихся олигопептидов гель-электрофорезом в присутствии SDS в Трис-трициновой системе.

### **1. Аналоги мРНК, использованные для аффинной модификации *gpS15e* и фактора *eRF1* в составе специфических комплексов рибосом**

Все использованные в настоящей работе аналоги мРНК содержали фенилаланиновый кодон UUU/UUC, за которым следовал смысловой или стоп-кодон, и перефторфенилазидогруппу (АТВ), которая была присоединена через различные линкерные группировки к остатку уридина, гуанозина или аденозина, либо к 3'-концевому фосфату (см. рис. 1 и табл. 1). Для введения АТВ-группы в различные положения олигорибонуклеотидов использована методология, основанная на том, что вначале к выбранному нуклеотиду присоединяют линкер с алифатической аминогруппой, по которой затем селективно вводят АТВ-группу путем бензоилирования N-гидроксисукцинимидным эфиром *n*-азидотетрафторбензойной кислоты. Для присоединения линкера по остатку гуанозина, олигонуклеотид с единственным остатком G обрабатывали 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламином (ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), при этом происходило присоединение остатка -RCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> селективно по атому N7 остатка G.

Производные олигорибонуклеотидов, несущие группу -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> на остатке уридина или аденозина, а также производные с линкерной группой -O-CH<sub>2</sub>CHONCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> на 3'-концевом фосфате были синтезированы и охарактеризованы в Лаборатории химии РНК (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). В экспериментах по сшивкам использовали аналоги мРНК, несущие метку <sup>32</sup>P на 5'-конце.



**Рис. 1.** Структурные формулы модифицированных остатков в составе использованных фотоактивируемых аналогов мРНК. Длина линкерной группировки, отделяющей азидогруппу от гетероциклического основания, у аналогов с модифицированным U или A составляет 11Å, а с модифицированным G - 14Å. Длина линкерной группировки, отделяющей азидогруппу от фосфата, у аналогов с модифицированным 3'-концевым фосфатом составляет 12Å.

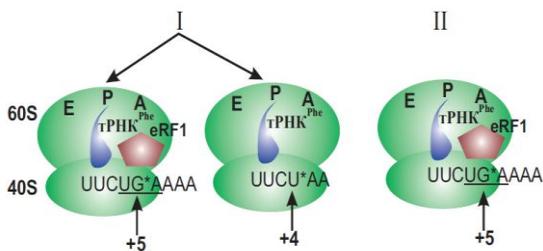
Таблица 1. Аналоги мРНК, использованные в настоящей работе. Звездочкой отмечены модифицированные нуклеозиды и 3'-концевой фосфат, структура которых приведена на рис.1, стоп-кодоны подчеркнуты. Обозначение аналога мРНК отражает его длину (цифра справа), положение модифицированного нуклеотида (цифра слева) и место присоединения фотоактивируемой группы в нем (остаток гетероциклического основания или 3'-концевой фосфат).

Аналоги мРНК	Нуклеотидная последовательность аналога мРНК
+4U6	UUC <u>U*</u> AA
+5U6	UUU <u>GU*</u> U
+6U6	UUC ACU*
+7U7	UUU AAC U*
+9U9	UUU AAC UCU*
+12U12	UUU AAC UCU CCU*
+4U7	UUC <u>U*</u> AA A
+5G9	UUC <u>UG*</u> A AAA
+6G9	UUC <u>UAG*</u> AAA
+7G9	UUC <u>UAA</u> G*AA
+5A9	UUC <u>UA*</u> A AAA
+6A9	UUC <u>UAA*</u> AAA
+7A9	UUC <u>UAA</u> A*AA
+6P6	UUC <u>UAA</u> p*
+7P7	UUC <u>UAA</u> Ap*

### 1.1. Модельные комплексы 80S рибосом с тРНК<sup>Phe</sup> и аналогами мРНК, в которых проводили аффинную модификацию рpS15e и eRF1

Типы комплексов, в которых проводили аффинную модификацию рpS15e и фактора eRF1, представлены на рис. 2 на примере аналогов +4U6 и +5G9. Для получения таких комплексов вначале аналоги мРНК фазировали на рибосоме с помощью тРНК<sup>Phe</sup>, которая направляла фенилаланиновый кодон UUU/UUC в Р-участок рибосомы с образованием комплекса типа I. В таком комплексе нуклеотид со сшивающей группой оказывался в положении от +4 до +7 относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке, т.е. в А-участке (в

декодирующем центре) или с 3'-стороны от кодона в этом участке. Комплексы типа II получали путем связывания комплексов типа I, образованных с участием аналогов мРНК, несущих стоп-кодон, с eRF1, который содержал His-хвост (LENNNNN), присоединенный к С-концу белка. Рекомбинантный eRF1 человека и его мутантные формы были получены в Лаборатории структурно-функциональной геномики (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН). В контрольных опытах использовали аналоги мРНК, содержащие модифицированные остатки в составе смысловых кодонов (UUCUG\*CAAA, UUCUCG\*AAA, UUCUCAG\*AA, UUCUA\*CAAA, UUCUCA\*AAA, UUCUCAr\*). Степень связывания аналогов мРНК с 80S рибосомами в присутствии тРНК<sup>Phe</sup> составляла приблизительно 0.7±0.1 моль аналога на моль 80S рибосом, а в отсутствие тРНК была на порядок ниже, что свидетельствует о специфичности связывания используемых аналогов мРНК с 80S рибосомами.



**Рис. 2.** Схематическое изображение модельных комплексов 80S рибосом с аналогами мРНК. А, Р и Е — тРНК-связывающие участки. Указаны положения модифицированных нуклеотидов относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке.

Для аффинной модификации gpS15e и eRF1 аналогами мРНК соответствующие комплексы облучали мягким УФ-светом с длиной волны >290 нм в условиях, когда происходит специфическая сшивка перфторфенилазидо-содержащих аналогов мРНК с рРНК и рибосомными белками, т.е. сшивка, зависящая от присутствия перфторфенилазидогрупп в аналогах мРНК (для обзора см., например, Грайфер и др., 2001).

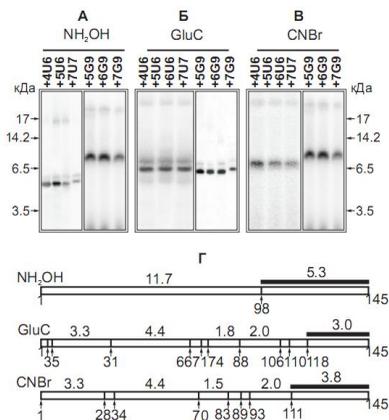
### 1.2. Выделение белков gpS15e и eRF1, сшитых с мечеными аналогами мРНК, из облученных комплексов рибосом

В случае аналогов мРНК со стоп-кодоном модифицированные белки — gpS15e и фактор терминации eRF1 выделяли непосредственно из облученных 80S комплексов рибосом типа II, очищенных от несвязавшихся компонентов (eRF1, аналога мРНК и тРНК<sup>Phe</sup>) центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (15-30%). Для выделения модифицированного gpS15e из облученных комплексов типа I вначале их разделяли на субчастицы с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (10-30%) в условиях диссоциации рибосом. Модифицированные 80S рибосомы или 40S субчастицы осаждали, разрушали и рибосомные компоненты разделяли 1D гель-электрофорезом в присутствии SDS. Полосы, соответствующие модифицированным gpS15e и eRF1, вырезали из высушенных радиоавтографированных гелей (положение данных полос на

электрофореграммах известно из работ (Bulygin et al., 2002, Graifer et al., 2004; Molotkov et al., 2006) и использовали в дальнейших экспериментах.

### 1.3. Определение участков *gpS15e*, сшивающихся с аналогами мРНК

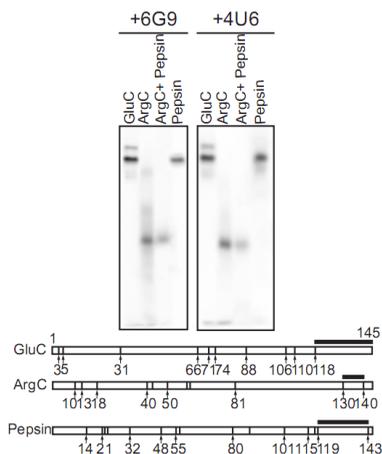
Модифицированный *gpS15e*, выделенный из облученных 80S рибосом или 40S субчастиц, в параллельных экспериментах гидролизуют гидроксиламином (расщепляет пептидную связь Asp-Gly), бромцианом (расщепляет связи после остатков метионина) и эндопротеиназой Glu-C (расщепляет связи после остатков глутамата) с последующим разделением образующихся продуктов гелеэлектрофорезом. Полипептидная цепь *gpS15e* имеет единственный сайт для гидролиза гидроксиламином (после Asp98), расщепление по которому приводит к образованию двух фрагментов (1-98 и 99-145), чьи молекулярные массы отличаются более, чем в два раза, 7 сайтов для расщепления бромцианом и 14 сайтов для GluC. Результаты анализа модифицированных олигопептидов, образующихся при расщеплении *gpS15e*, сшитого с мечеными аналогами мРНК, гидроксиламином, GluC и бромцианом, представлены на рис. 3 (панели А-В). При расщеплении гидроксиламином во всех случаях наблюдали образование олигопептида, чья молекулярная масса (после вычета массы сшитого с ним аналога мРНК) составляла приблизительно 5.3 кДа, что соответствует фрагменту 98-145 *gpS15e* (рис. 3, панели А и Г). Расщепление бромцианом позволило сузить участок сшивки до фрагмента 111-145 (рис. 3В), а Glu-C – до фрагмента 119-145 (рис. 3В, Г).



**Рис. 3.** Электрофоретическое разделение продуктов, образующихся при расщеплении модифицированного *gpS15e*, гидроксиламином (А), GluC (Б) и CNBr (В) (радиоавтографы). Слева на панели указаны положения маркеров молекулярной массы белков. (Г) Схемы расщепления *gpS15e* гидроксиламином, GluC и CNBr, сверху указаны молекулярные массы образующихся фрагментов, рассчитанные с помощью программы Peptide cutter ([www.expsasy.org](http://www.expsasy.org)). На схемах отмечен модифицированный фрагмент *gpS15e*.

Для более точной локализации участка сшивки внутри фрагмента 119-145 модифицированный *gpS15e* расщепляли эндопротеазой ArgC, которая гидролизует пептидную связь после остатков аргинина. На рис. 4 в качестве примера приведены результаты расщепления *gpS15e*, модифицированного аналогами мРНК +4U6 и +6G9 ArgC. Видно, что при расщеплении ArgC образуется фрагмент, электрофоретическая подвижность которого существенно выше, чем подвижность фрагмента 119-145. Это позволяет исключить из дальнейшего рассмотрения фрагмент 119-130, поскольку в случае модификации внутри этого фрагмента расщепление ArgC приводило бы к образованию

фрагмента 82-130 с электрофоретической подвижностью намного меньшей, чем подвижность фрагмента 119-145. Таким образом, модифицированным мог быть декапептид 131-140, пентапептид 141-145 или пентадекапептид 131-145, образование которого возможно в случае сшивки по Arg140, если она препятствует гидролизу ArgC пептидной связи после этого остатка. Для того, чтобы выбрать между этими пептидами, радиоактивную полосу, соответствующую модифицированному олигопептиду, полученному при расщеплении сшитого rpS15e с помощью ArgC, вырезали из высушенной электрофореграммы и обрабатывали пепсином. Видно, что обработка пепсином не приводит к изменению электрофоретической подвижности олигопептида, что однозначно указывает на то, что во всех случаях участок сшивки находится во фрагменте 131-140, не содержащем сайта для расщепления пепсином (рис. 4Б).



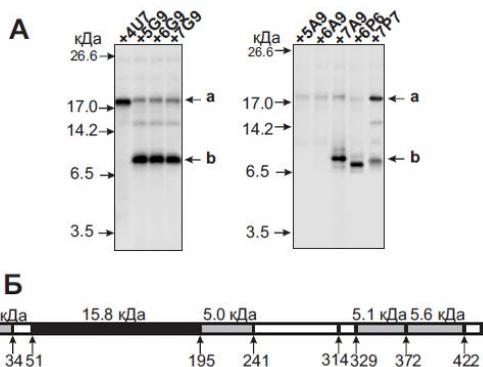
**Рис. 4.** Определение участка сшивки аналогов мРНК в районе 119-145 rpS15e. Электрофоретическое разделение модифицированных продуктов, образующихся при расщеплении rpS15e, сшитого с мечеными аналогами мРНК +4U6 или +5G9, протеазами GluC и ArgC (дорожки GluC и ArgC); при расщеплении пепсином меченого продукта, образующегося в результате обработки модифицированного rpS15e ArgC (дорожки ArgC+pepsin), и при гидролизе модифицированного rpS15e пепсином (контроль для проверки активности фермента) (дорожка pepsin). Под радиоавтографами приведены карты расщепления rpS15e соответствующими протеолитическими агентами.

Таким образом, можно заключить, что все нуклеотиды кодона мРНК в А-участке 80S рибосомы соседствуют с декапептидом 131-PGIGATHSSR-140 rpS15e, независимо от того, какого типа кодон (смысловый или стоп) находятся в А-участке, и присутствия eRF1 в случае стоп-кодона.

### 1.3. Определение участков eRF1, сшивающихся с аналогами мРНК

Сначала модифицированный eRF1 расщепляли с помощью CNBr по остаткам метионина. Фактор терминации eRF1 человека содержит восемь остатков метионина, поэтому в результате CNBr-индуцированного гидролиза должны образовываться 9 фрагментов, если не один из восьми остатков метионина не подвергается модификации, которая может препятствовать расщеплению по соответствующему сайту (см., например, Megli et al., 1985). Из данных, представленных на рис. 5, видно, что во всех дорожках, за исключением +4U7, присутствуют две радиоактивные полосы (обозначенные как "а" и "б"). Верхняя полоса "а" соответствует фрагменту, масса которого после вычета

массы сшитого аналога мРНК (3.2 кДа), составляет около 16 кДа. Очевидно, что эта полоса относится к фрагменту 52-195 eRF1 (рис. 5Б).



**Рис. 5.** Электрофоретическое разделение модифицированных олигопептидов, образующихся при расщеплении бромцианом eRF1, сшитого с мечеными аналогами мРНК (А) Радиоавтографы гелей, обозначения дорожек соответствуют обозначениям аналогов мРНК (табл. 1). Слева от панелей указаны положения маркеров молекулярной массы белков. (Б) Схема расщепления eRF1 с помощью CNBr; сверху указаны молекулярные массы образующихся фрагментов,

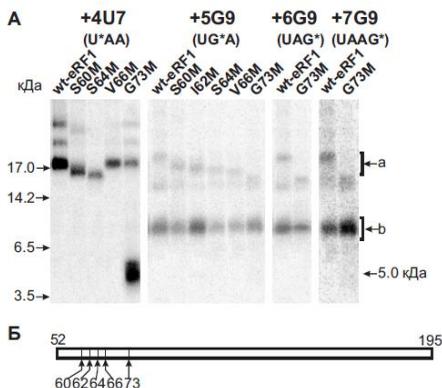
рассчитанные с помощью программы Peptide cutter ([www.exPASy.org](http://www.exPASy.org)).

#### 1.4. Идентификация участков сшивки во фрагменте eRF1, соответствующем полосе “а”, для аналогов мРНК с перфторфенилазидогруппой на остатке уридина или гуанозина

Для установления участка сшивки аналогов мРНК внутри фрагмента 52-195 использовали мутантные формы eRF1, которые содержали точечные замены функционально несущественных аминокислот на метионин для создания в этом фрагменте дополнительных мест для расщепления полипептидной цепи с помощью CNBr. В случае аналога +4U7 использовали мутанты с заменой в области 60-73 eRF1, поскольку наиболее вероятный участок сшивки этого аналога мРНК с eRF1 находится в районе мотива 61-NIKS-64 eRF1 человека (Chavatte et al., 2002). При расщеплении бромцианом мутантов S60M и S64M, сшитых с меченым аналогом +4U7, наблюдали образование модифицированного олигопептида с электрофоретической подвижностью несколько большей, чем подвижность фрагмента 52-195, образующегося при гидролизе модифицированного eRF1 дикого типа (wt-eRF1) (рис. 6, сравнить дорожки wt-eRF1, S60M и S64M). Полученные данные указывают на то, что участок сшивки во фрагменте 51-195 eRF1 находится с С-концевой стороны от положения, в которое введен дополнительный остаток метионина. С другой стороны, расщепление модифицированного мутанта G73M приводило к образованию короткого фрагмента с молекулярной массой около 5 кДа, который может соответствовать только фрагменту 52-73. Таким образом, можно заключить, что участок сшивки располагается во фрагменте 64-73, при этом наиболее вероятной мишенью для модификации является остаток V66, поскольку модифицированный мутант V66M eRF1 был устойчив к действию CNBr (рис. 6, дорожка V66M).

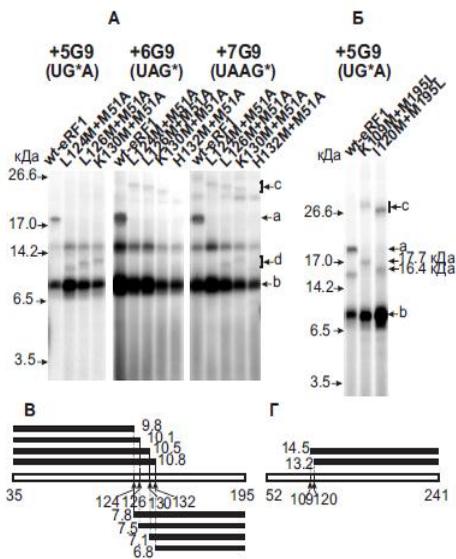
Для определения участков сшивки во фрагменте 74-195 использовали набор двойных мутантов eRF1, в которых был заменен остаток метионина в положении

51 и введен новый сайт для CNBr-индуцированного гидролиза в районе YxCxxxF-мотива. Из данных, представленных на рис. 7, видно, что при расщеплении этих мутантов, шитых с меченым аналогом +5G9, продукт, соответствующий полосе “а”, исчезает, но появляется новый продукт (рис. 7А полоса “d”), подвижность которого уменьшается в ряду L124M+M51A, L126M+M51A, K130M+M51A, что указывает на расположение участка шивки во фрагменте 36-124 (рис. 7, сравнить панели А и Б). Учитывая данные, полученные для мутантов с заменами в районе 60-73 (рис. 6), можно заключить, что участок шивки находится во фрагменте 74-124.



**Рис. 6.** Картирование участков шивки аналогов мРНК в районе 60-73 eRF1. (А) Электрофоретическое разделение продуктов расщепления модифицированных мутантов (указанных над соответствующими дорожками) бромцианом. Полосы “а” и “б” указаны по аналогии с рис. 5. Положения маркеров молекулярной массы белков приведены слева от панелей. Полосы выше полосы “а”, соответствуют продуктам неполного гидролиза. (Б) Схематическое представление сайтов расщепления во фрагменте 52-195, соответствующего полосе “а”.

В случае аналога +6G9, CNBr-индуцированный гидролиз модифицированных мутантов eRF1 также приводил к исчезновению полосы “а”, но при этом образования полосы, соответствующей продукту полного гидролиза, не наблюдали. Это могло быть связано с тем, что радиоактивная полоса, соответствующая продукту полного расщепления, совпадает с интенсивной полосой, соответствующей фрагменту “б”. С другой стороны, для всех модифицированных мутантов (за исключением H132M+M51A) в верхней части геля наблюдали полосы “с”, которые, очевидно, соответствуют продуктам неполного гидролиза модифицированных мутантных форм eRF1. Такие фрагменты могли образовываться, если не происходило расщепления, например, по остаткам M195 и M241 (рис. 7А). Таким образом, участок шивки мутантов eRF1 с аналогом +6G9 находится с С-концевой стороны от положения 124, 126 или 130, в которое введен дополнительный остаток метионина, то есть во фрагменте 131-195. Поскольку мутант H132M+M51A устойчив к действию бромциана, можно предположить, что именно остаток Met132 подвергается модификации. Однако в wt-eRF1 шивка, возможно, происходит с Phe131, поскольку остаток гистидина (в положении 132) неспособен образовывать ковалентные шивки с перфтофенилазидами (Т.С. Годовикова, неопубликованные данные).



**Рис. 7.** Картирование участков сшивки аналогов мРНК в районах 74-195 и 74-124 eRF1 с использованием набора мутантов eRF1 (указаны над соответствующими дорожками). (А) и (Б) - электрофоретическое разделение продуктов гидролиза CNBr wt-eRF1 и мутантов L124M+M51A, L126M+M51A, K130M+M51A и I120M+M51A, сшитых с аналогами +5G9, +6G9 и +7G9 (А) и мутантов K109M+M51A и I120M+M51A, сшитых с аналогом +5G9 (Б). Полосы “а” и “б” отмечены по аналогии с рис. 5; природа полосы, расположенной между полосами “а” и “d”, не установлена; полосы “с” на панели (А) отнесены к продуктам неполного гидролиза модифицированных мутантов. Ожидаемые молекулярные массы продуктов гидролиза модифицированных мутантов

K109M+M51A и I120M+M51A и положения соответствующих им полос указаны справа от панели (Б). Положения маркеров молекулярной массы белков указаны слева от панелей. (Б) и (Г) Карты расщепления фрагментов 35-195 (Б) и 52-241 (Г) мутантов eRF1 с указанием рассчитанных молекулярных масс образующихся пептидных фрагментов.

Результаты, полученные для аналога мРНК +7G9 (рис. 7А), указывают на существование двух участков сшивки во фрагменте 52-195 eRF1. Одним из участков, соответствующих полосе “с”, вероятно, является Phe131 (по аналогии с аналогом мРНК +6G9; см. выше), а о наличии второго участка сшивки свидетельствует присутствие полосы “d” в дорожках с мутантами L126M+M51A и K130M+M51A, которой не было в случае аналога +6G9 (рис. 7А). Следует отметить, что в случае мутанта L124M+M51A полосы “d” не наблюдали, что может быть связано либо с отсутствием участка сшивки внутри фрагмента 1-124 eRF1, либо с модификацией Met124, которая делала этот остаток устойчивым к действию CNBr. При отсутствии участка сшивки внутри фрагмента 1-124 появление радиоактивной полосы “d” в дорожке с мутантом L126M+M51A может указывать на то, что модификация происходила по Tyr125. Сшивка с аминокислотным остатком в положении 126 представляется маловероятной, поскольку в этом случае модифицированный мутант L126M+M51A eRF1 был бы устойчив к CNBr-индуцированному гидролизу. С другой стороны, фрагмент 1-126 мог соответствовать модификации по положению 124, в котором у wt-eRF1 находится остаток Leu и по которому не происходило бы расщепления в случае мутанта L124M+M51A, но при этом нельзя было бы исключить сшивку с Tyr125. Таким образом, учитывая все вышесказанное, можно предположить, что вторым участком сшивки для аналога мРНК +7G9 является Leu124 и/или Tyr125.

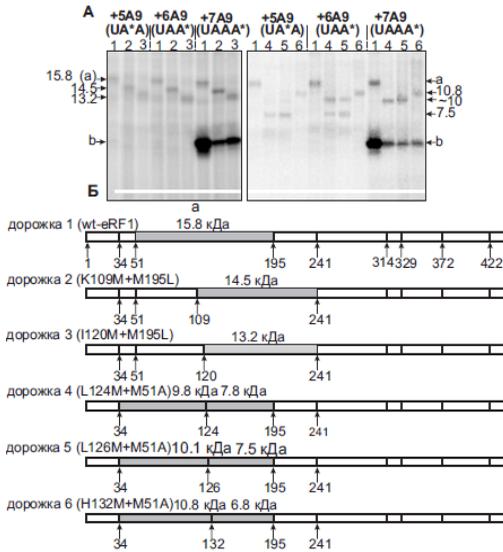
Для более точной локализации участка сшивки аналога +5G9 во фрагменте 74-124 были использованы мутанты M195L+K109M и M195L+I120M eRF1 (рис. 7Б). Сравнение данных электрофоретического анализа с картой расщепления eRF1 показало, что участок сшивки расположен во фрагменте 121-241, который перекрывается с фрагментом 74-124 (см. выше) трипептидом в положениях 121-124 eRF1. Таким образом, участок сшивки аналога +5G9 находится во фрагменте 121-124 eRF1.

### ***1.5. Идентификация участков сшивки eRF1 во фрагменте, соответствующем полосе “а”, для аналогов мРНК с перфторфенилазидогруппой на остатке аденозина или 3'-концевом фосфате***

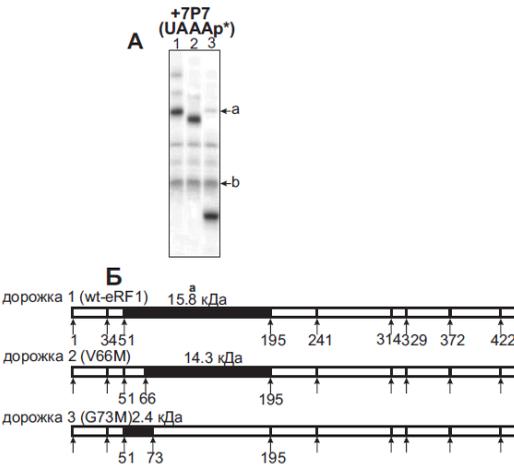
Для определения участка сшивки аналогов мРНК с модифицирующей группой на остатке аденозина использовали те же наборы мутантов с двойными заменами, что и в случае аналогов с модифицированными остатками гуанозина (рис. 8). Для всех аналогов мРНК вместо фрагмента 52-195 (полосы “а”) образуются модифицированные фрагменты с более высокой электрофоретической подвижностью, при этом подвижность этих фрагментов у мутанта K109M+M51A ниже, чем у мутанта I120M+ M195L (рис. 8А, сравнить дорожки 2 и 3). Эти данные указывают на то, что участок сшивки аналогов мРНК находится с С-концевой стороны от положений 109 и 120, то есть во фрагменте 121-195. Использование другого набора мутантов eRF1 позволило более точно идентифицировать участок сшивки фактора с этими аналогами мРНК (рис. 8А, правая панель). Сравнение электрофоретической подвижности фрагментов, образующихся при расщеплении мутантов L124M+M51A, L126M+M51A и H132M+M51A (рис. 8А, правая панель, мРНК +5A9, дорожки 4-6), сшитых с меченым аналогом +5A9, с картой расщепления eRF1 (рис. 8Б) показало, что модифицированными были фрагменты 125-195, 127-195 и 35-132. Следовательно, участок сшивки находится в районе 127-132 eRF1.

Подобные рассуждения в случае тех же мутантов eRF1, сшитых с аналогом +7A9, позволили заключить, что модификации подвергаются фрагменты 35-124, 35-126 и 35-132 (рис. 8А, правая панель, сравнить дорожки 4-6 для аналога +7A9 и рис. 8Б). Учитывая данные по локализации участка сшивки во фрагменте 121-195 (рис. 8А, дорожки 1, 2 и 3 для аналога +7A9), можно сделать вывод, что с аналогом +7A9 сшивался фрагмент 120-124 eRF1. В случае аналога +6A9, в отличие от аналогов +5A9 и +7A9, наблюдали образование двух модифицированных фрагментов, один из которых соответствовал фрагменту 121-124, а другой – фрагменту 124-132 (рис. 8А, правая панель, сравнить дорожки 4-6 для аналогов +6A9, +7A9, +5A9).

В случае аналога +7P7 для идентификации участка eRF1, соответствующего полосе “а”, применяли набор мутантов, которые содержали точечные замены аминокислотных остатков на остатки метионина в районе NIKS-мотива. Было показано, что участок сшивки аналога +7P7 в eRF1 находился во фрагменте 67-73 eRF1 (рис. 9Б, сравнить дорожки 2 и 3). Что касается аналога +6P6, то участок сшивки в районе 52-195 eRF1 идентифицировать не удалось, поскольку выход продукта сшивки, соответствующего полосе “а”, был слишком низким (см. рис. 5).



**Рис. 8.** Картирование участков шивки аналогов мРНК во фрагменте 52-195 eRF1 с использованием тех же мутантов, что и в случае аналогов с модифицированным остатком G (см. рис. 7). (А) – электрофоретическое разделение продуктов расщепления мутантов, шитых с мечеными аналогами мРНК, бромцианом. Ожидаемые молекулярные массы фрагментов, шитых с аналогами мРНК, и положения соответствующих им полос указаны с обеих сторон от панелей (без учета молекулярной массы шитых аналогов). Полосы “а” отмечены по аналогии с рис. 5. (Б) Схема расщепления eRF1 с помощью CNBr, сверху указаны рассчитанные молекулярные массы (кДа) образующихся фрагментов; серым цветом выделены модифицированные фрагменты eRF1.

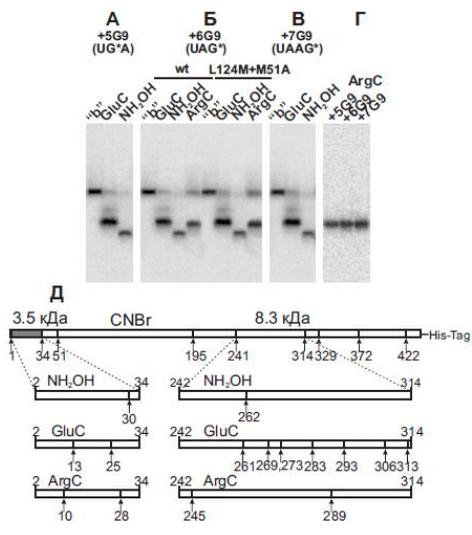


**Рис. 9.** Картирование участка шивки аналога +7P7 внутри фрагмента 60-73 с использованием мутантных форм eRF1, несущих замены внутри этого фрагмента. (А) – электрофоретическое разделение продуктов гидролиза wt-eRF1 и мутантов V66M и G73M, шитых с аналогом +7P7, с помощью CNBr. Фрагменты “а” и “б” отмечены по аналогии с рис. 5. (Б) Схемы расщепления eRF1 и используемых мутантов, на которых черным цветом выделены модифицированные фрагменты и указаны их рассчитанные молекулярные массы (без учета массы шитого аналога).

### 1.6. Идентификация участков шивки во фрагменте eRF1, соответствующем полосе “б”, для аналогов мРНК с перфторфенилазидогруппой на остатке гуанозина

Молекулярная масса фрагментов, соответствующих полосам “б”, наблюдаемым при расщеплении eRF1, шитого с мечеными аналогами мРНК (рис. 5А), после вычета массы шитых с ними остатков аналога мРНК составляет от 5 до 6 кДа. Поэтому участок шивки может находиться в любом из кандидатных фрагментов (2-34, 195-241, 329-372, 372-422). На основании данных по расщеплению мутантов K109M+M195L и I120M+M195L, шитых с мечеными аналогами мРНК (рис. 7Б, для аналогов +6G9 и +7G9 соответствующие

радиоавтографы не приведены), фрагмент 196-241 может быть исключен из дальнейшего рассмотрения. Среди оставшихся фрагментов только два фрагмента, а именно 2-34 и 241-314, содержат сайты для расщепления гидроксиламином. Из представленных данных (рис. 10А-В) видно, что в случае аналогов +5G9, +6G9 и +7G9 продукт, соответствующий полосе “b”, селективно расщепляется гидроксиламином. Аналогичные результаты были получены при расщеплении модифицированных мутантов eRF1 (рис. 10Б; в качестве примера приведены данные по расщеплению мутанта L124M+M51A). Следовательно, участок сшивки может находиться в одном из двух фрагментов: 2-34 или 241-314. Результаты, представленные на рис. 10, позволяют однозначно отнести полосу “b” к участку 2-34, поскольку электрофоретическая подвижность фрагмента, образующегося при расщеплении GluC ниже, чем при обработке гидроксиламином. Если бы модификации подвергался фрагмент 241-314 eRF1, то обработка продукта, соответствующего полосе “b”, GluC приводила бы к образованию фрагмента такого же размера (если участок сшивки в районе 242-262) или существенно более короткого (если участок сшивки в районе 263-314), чем фрагмент, образующийся при гидролизе гидроксиламином.



**Рис. 10.** Картирование участков сшивки аналогов мРНК во фрагменте, соответствующем полосе “b”, образующемся при расщеплении бромцианом eRF1, сшитого с мечеными аналогами мРНК +5G9, +6G9 или +7G9, и мутанта L124M+M51A, сшитого с аналогом +6G9. (А)–(Г) Электрофоретическое разделение продуктов, образующихся при расщеплении фрагмента, соответствующего полосе “b”, гидроксиламином, GluC или ArgC. (Д) Схема расщепления eRF1 бромцианом (фрагмент 2-34 выделен серым цветом, сверху указана его молекулярная масса) и схемы гидролиза фрагмента 2-34 гидроксиламином, GluC или ArgC.

Сравнение взаимного расположения полос, соответствующих модифицированным фрагментам, образующимся при расщеплении полосы “b” гидроксиламином, GluC или ArgC (рис. 10А-Г), показало, что участок сшивки аналогов находится в составе тетрапептида в положениях 31-34 eRF1, а не во фрагменте 2-30. В последнем случае расщепление гидроксиламином приводило бы к появлению фрагмента более длинного, чем фрагменты, образующиеся при расщеплении GluC или ArgC (рис. 10, сравнить дорожки GluC и ArgC). Таким образом, все аналоги мРНК сшивались с фрагментом 31-34 eRF1. Более того, полученные результаты позволяют сузить участок сшивки 31-34 до 31-33, так как, если бы остаток метионина в положении 34 был модифицирован,

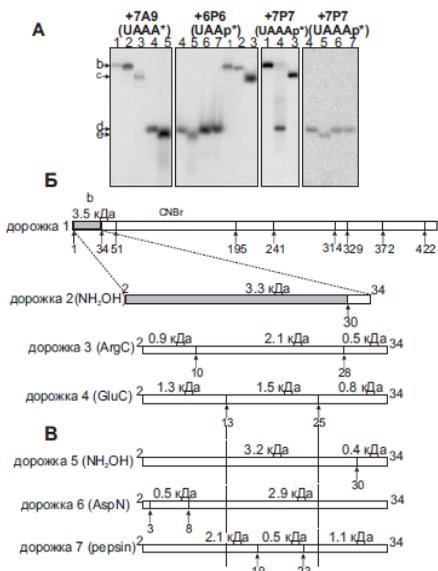
расщепления CNBr по этому сайту не происходило бы, приводя к образованию фрагмента 2-51. Однако в этом случае расщепление мутантов eRF1, в которых остаток Met51 был заменен на остаток аланина, приводило бы к появлению более длинного модифицированного продукта по сравнению с фрагментом “b”, образующимся при расщеплении wt-eRF1. Из данных, представленных на рис 10Б (правая часть панели), видно, что электрофоретическая подвижность фрагмента “b”, образующегося при расщеплении с помощью CNBr мутанта L124M+M51A, сшитого с аналогом +6G9, такая же, как у соответствующего фрагмента wt-eRF1. Это означает, что остаток Met34 не модифицировался. Следовательно, участок сшивки находится во фрагменте 31-GTS-33 eRF1.

### ***1.7. Идентификация участков сшивки во фрагменте eRF1, соответствующем полосе “b”, для аналогов мРНК с перфторфенилазидогруппой на остатке аденозина или 3'-концевом фосфате***

При идентификации модифицированного фрагмента eRF1, соответствующего полосе “b”, наблюдаемой с мечеными аналогами +7A9, +6P6 и +7P7, участок 196-241 был исключен из рассмотрения на основании данных, полученных с мутантами K109M+M195L и I120M+M195L (рис. 8). Фрагмент 373-422 eRF1 был исключен на основании данных по расщеплению модифицированных мутантов eRF1, несущих в этом районе белка единичные замены аминокислотных остатков на остаток метионина (соответствующие радиоавтографы не приведены). Для того, чтобы выбрать между оставшимися кандидатными фрагментами 2-34 и 330-372, кусочки геля, соответствующие радиоактивным полосам “b”, обработали эндопротеиназой ArgC, которая имеет сайт для расщепления во фрагменте 2-34, но не во фрагменте 330-372. Как видно из данных, представленных на рис. 11, во всех случаях продукт, соответствующий полосе “b”, оказался чувствительным к действию ArgC, что указывает на расположение участка сшивки во фрагменте 2-34 (рис. 11А, сравнить дорожки 1 и 3).

Для идентификации участка сшивки в районе 2-34 eRF1 продукт, соответствующий полосе “b”, расщепляли в параллельных экспериментах с помощью гидроксиламина, GluC и ArgC. Видно, что обработка гидроксиламином приводит к небольшому сдвигу полосы “b” (рис. 11, сравнить дорожки 1 и 2), что позволяет исключить из дальнейшего рассмотрения фрагмент 31-34. Сравнение результатов по расщеплению фрагмента “b” с помощью GluC и ArgC показало, что во всех случаях гидролиз этого фрагмента ArgC приводит к образованию продукта (рис. 11А, дорожки 3, полосы “c”) с электрофоретической подвижностью, существенно меньшей, чем у фрагмента, полученного при обработке GluC (рис. 11А, дорожки 4, полосы “d”). Эти результаты указывают на то, что полосы “c” соответствуют фрагменту 11-28 eRF1. Для более точной локализации участка сшивки внутри района 11-28 модифицированные фрагменты, образующиеся при расщеплении с помощью GluC продуктов, соответствующих полосам “b” (рис. 11А, полосы “d”), вырезали из гелей и обрабатывали в параллельных экспериментах гидроксиламином, эндопептидазой AspN и пепсином (рис. 11А и С, дорожки 5-7). Из трех фрагментов, которые

могут образовываться при расщеплении продукта “b” с помощью GluC, только один 26-34 имеет сайт для расщепления гидроксиламином (рис. 11Б, дорожка 4 и рис. 11С, дорожка 5). Как видно из данных, представленных на рис. 11А, для всех аналогов мРНК продукт “d” оказался чувствительным к действию гидроксиламина, но не пепсина и Asp-N, что однозначно указывает на то, что полоса “d” соответствует модифицированному фрагменту 26-34 eRF1. Учитывая, что участок сшивки аналогов +7A9, +6P6 и +7P7 находится в районе 11-28 eRF1, можно заключить, что модификации подвергается трипептид 26-28 eRF1.



**Рис. 11.** Картирование участков сшивки аналогов мРНК, соответствующих полосе “b”, во фрагменте 2-34 eRF1. (А) Электрофоретическое разделение фрагментов, образующихся при расщеплении меченого продукта, соответствующего полосе “b”, гидроксиламином (дорожка 2), ArgC (дорожка 3) или GluC (дорожка 4). Дорожки 5-7 — расщепление гидроксиламином, AspN или пепсином, соответственно, меченого продукта “d” (дорожка 4), полученного при гидролизе GluC фрагмента “b”. (Б) Схема расщепления eRF1 CNBr и схемы гидролиза фрагмента 2-34 гидроксиламином, ArgC или GluC. Серым цветом выделены модифицированные фрагменты. (В) Схема расщепления гидроксиламином AspN или пепсином фрагментов 2-13, 14-25 и 26-34 (отмеченных вертикальными пунктирными линиями) внутри фрагмента 2-34.

### 1.8. Участки eRF1, сшивающиеся с аналогами мРНК

Таким образом, аналоги мРНК сшиваются с тремя отдельными районами в N-доме белка. В случае аналогов мРНК с модифицированным остатком G во втором, третьем или четвертом положении терминирующего тетраплетта фрагмент 31-33 был основной мишенью сшивки, тогда как модифицированные остатки A в тех же положениях аналога мРНК сшивались с аминокислотными остатками в районе YxSxxxG-мотива, который был основной мишенью сшивки для аналогов с модифицированным A во втором или третьем положении стоп-кодона. Модифицированный A в четвертом положении терминирующего тетраплетта сшивался преимущественно с трипептидом 26-AAR-28, который также был главной мишенью модификации для аналога мРНК с реакционноспособной группой на 3'-концевом фосфате стоп-кодона UAA. При расположении модифицирующей группы на 3'-концевом фосфате тетраплетта UAAA сшивка происходила в основном не с трипептидом 26-AAR-28, а с фрагментом 67-73, соседствующим с мотивом 61-NIKS-64 eRF1. Район NIKS-мотива, а именно остаток V66 eRF1, сшивался с аналогом +4U7.

## **2. Обсуждение результатов по аффинной модификации *gpS15e* и *eRF1* аналогами мРНК в составе специфических комплексов 80S рибосом человека**

Правомерность использования коротких перфторфенилазидо-содержащих аналогов мРНК для изучения непосредственного окружения нуклеотидов мРНК в составе специфических комплексов 80S рибосом следует из сравнения результатов по аффинной модификации 18S рРНК этими аналогами (Graifer et al., 2004, Molotkov et al., 2006) с данными, полученными с помощью более длинных аналогов, несущих остаток  $s^4U$ , способный образовывать шивки нулевой длины (Pisarev et al., 2008). Оказалось, что при использовании разных типов аналогов мРНК схожие наборы нуклеотидов 18S рРНК подвергаются модификации, несмотря на различия в природе сшивающих групп и разные способы комплексообразования аналогов мРНК с рибосомами. Положения этих нуклеотидов во вторичной структуре 18S рРНК (Graifer et al., 2004, Molotkov et al., 2006) практически точно совпадают с положениями нуклеотидов 16S рРНК, контактирующих с соответствующими нуклеотидами мРНК в составе комплексов 70S рибосом по данным PCA (Yusupov et al., 2001, Selmer et al., 2006). Таким образом, все вышесказанное позволяет рассматривать декапептид 131-PGIGATHSS-140 *gpS15e* и участки 26-28, 31-33, 121-131 и 67-73 *eRF1*, сшивающиеся с аналогами мРНК, как непосредственное пептидное окружение смыслового кодона или стоп-сигнала в А-участке 80S рибосомы.

### **2.1. Сравнение результатов, по аффинной модификации *gpS15e* с данными крио-ЭМ и PCA рибосом про- и эукариот**

Проведено сопоставление полученных результатов с данными PCA рибосом низших эукариот. В обеих доступных на сегодняшний день кристаллографических моделях отсутствуют мРНК и тРНК (Yusupov et al., 2010, Van et al., 2010). Тем не менее, можно оценить расстояние между последним картированным на моделях аминокислотным остатком *gpS15e* и первым нуклеотидом кодона в А-участке рибосомы, вычислив расстояние от этого остатка до нуклеотида 18S рРНК, соответствующего нуклеотиду 16S рРНК, контактирующему с первым нуклеотидом кодона в А-участке 70S рибосомы. В одной из этих моделей (Van et al., 2010) это расстояние составляет  $\sim 26\text{\AA}$ , что хорошо согласуется с данными настоящей работы, если учесть, что в обсуждаемой модели у *gpS15e* отсутствуют аминокислотные остатки в положениях, соответствующих фрагменту 130-145 *gpS15e* человека. Таким образом, использование аналогов мРНК, несущих перфторфенилазидогруппу в заданном положении, позволило получить информацию о тонкой структуре декодирующего центра рибосом млекопитающих на том уровне, которого пока не удалось достичь с помощью PCA даже для рибосом низших эукариот.

Что касается крио-ЭМ моделей рибосом эукариот, то следует упомянуть недавно опубликованную модель 80S рибосом дрожжей (Beckman et al., 2010a, 2010b), в которую с помощью компьютерного моделирования встроен фрагмент мРНК. Результаты настоящей работы не согласуются с этой моделью, поскольку в ней минимальное расстояние между первым нуклеотидом кодона в А-участке и декапептидом, соответствующим фрагменту 131-140 в *gpS15e*, превышает  $40\text{\AA}$ , что

в несколько раз больше радиуса действия АТВ-группы в аналогах мРНК. Обсуждаемая модель также противоречит данным обеих рассмотренных выше работ по РСА. Так, в кристаллографических моделях С-концевой фрагмент рpS15e, следующий за последним консервативным мотивом белка (LGEF/LAEF), неструктурирован, тогда как в крио-ЭМ модели после этого мотива следует  $\alpha$ -спираль, которая не позволяет С-концевому фрагменту белка дотянуться до декодирующего центра рибосомы.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков семейства рpS19p показало, что идентифицированный в настоящей работе декапептид 131-PGIGATHSS-140 рpS15e высококонсервативен у эукариот и архей, но почти не имеет гомологии с С-концевым фрагментом белка S19p эубактерий. Следует отметить, что лишь короткие фрагменты этой последовательности были найдены в Protein Data Base для некоторых других семейств белков. Все это указывает на важную роль декапептида в положениях 131-140 в процессе трансляции у эукариот и, возможно, у архей. В процессе элонгации этот декапептид может вносить вклад в фиксацию кодона мРНК в декодирующем центре рибосомы, обеспечивая таким образом более высокую точность трансляции и меньшую вероятность сдвига рамки считывания, а в процессе терминации он может контактировать с eRF1, поскольку рpS15e практически полностью экранируется фактором от сшивки с мРНК, несущей  $s^4U$  в первом положении стоп-кодона (Chavatte et al., 2003, Bulygin et al., 2005).

## **2.2. Фрагменты eRF1, соседствующие со стоп-сигналом мРНК в А-участке 80S рибосомы**

Высококонсервативные фрагменты N-домена eRF1 – 31-GTx-33, 63-73 (район NIKS-мотива) и 121-132 (район YxCxxxF-мотива), обнаруженные среди мишеней модификации аналогами мРНК со сшивающей группой на остатках G или A (табл. 2), удалены друг от друга в первичной структуре eRF1. Следовательно, участок узнавания стоп-кодона в eRF1 образован тремя отдельными районами его N-домена, которые оказываются сближенными со стоп-кодоном и друг с другом в А-участке терминаторного комплекса 80S рибосом. Сшивка аналогов мРНК с фотоактивируемой группой на 3'-концевом фосфате с фрагментом 26-28 eRF1 (табл. 2), указывает на то, что рибозо-фосфатный остов стоп-сигнала сближен с этим трипептидом. Можно предположить, что положительно заряженный остаток лизина или аргинина в положении 28 eRF1 взаимодействует с 3'-концевой фосфатной группой стоп-кодона. Такое взаимодействие может вносить вклад в энергию взаимодействия eRF1 и терминирующего кодона. Участок 67-73 eRF1, сшивающийся с аналогом, несущим модифицированную группу на 3'-концевом фосфате терминирующего тетраплетта (табл. 2), содержит остатки (в положениях 70, 71), которые, согласно литературным данным (Cheng et al., 2009, Eliseev et al., 2010), вовлечены в процесс связывания/распознавания пуринов стоп-кодона. Однако механизм, с помощью которого данные остатки eRF1 могут быть вовлечены в этот процесс, остается неизвестным. На основании данных по сшивкам, можно предположить, что район 70-71 eRF1 участвует, скорее всего, во взаимодействиях,

обеспечивающих поддержание специфической конформации N-домена eRF1, не контактируя с пуринами стоп-кодона.

К настоящему времени накоплено много данных, указывающих на участие YxCxxxF-мотива в процессе распознавания пуринов стоп-кодона (см., например, Cheng et al., 2009). Результаты по сшивкам eRF1 с аналогами мРНК хорошо согласуются с этими данными (табл. 2) и являются первым экспериментальным доказательством того, что фрагмент 121-131, содержащий YxCxxxF-мотив в положениях 125-131, соседствует с пуринами различных стоп-кодонов в терминационных комплексах 80S рибосом.

Таблица 2. Фрагменты eRF1, сшивающиеся с аналогами мРНК, и аминокислотные остатки, соседствующие с модифицированными нуклеотидами аналогов по данным молекулярного моделирования

Аналоги мРНК (рис. 1)	Распределение сшивок между фрагментами в N-домене в %** (в скобках указаны мишени модификации)	Аминокислотные остатки eRF1, соседствующие с модифицированными нуклеотидами аналогов по данным молекулярного моделирования
UUCUG*A AAA	22 (N121-L124) 78 (G31-S33)	G31-T32, K63, C127, L312-E324, K354-K360
UUCUAG* AAA	24 (F131) 76 (G31-S33)	T32-S33, N67-V71, Y125, K354- D359, E370
UUCUAA G*AA	25 (L124, F131) 75 (G31-S33)	G31-T32, N67-V71, Y125-K130, K360- H366
UUCUA*A AAA	100 (C127-H132)	R65, V66
UUCUAA* AAA	100 (N121-L124, L124-H132)	K63-V66
UUCUAA A*AA	10 (N121-L124), 90 (A26-R28)	R65, E365
UUCUAAp*	>95 (A26-R28)	E104, T362-E367
UUCUAAA*p	75 (N67-G73), 25 (A26-R28)	R28, R29, R65, V101-E103, N129

\*Нуклеотид, несущий перфторфенилазидогруппу

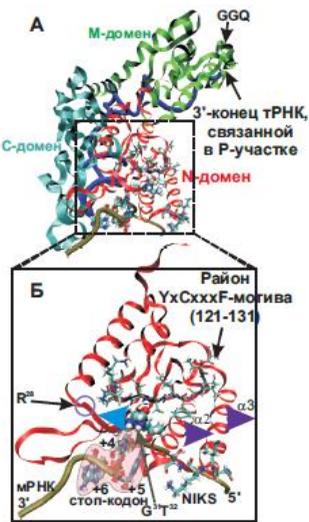
\*\*Расчитано из данных, представленных на рис. 5, в процентах от общего количества аналога мРНК, сшитого с eRF1. Относительная ошибка составляла ~10%.

Результаты настоящей работы показывают, что мишени сшивки в eRF1 зависят от природы модифицированного пурина (табл. 2), свидетельствуя о различном расположении eRF1 относительно остатков А и G стоп-сигнала в терминационном комплексе 80S рибосом. Дипептид 31-GT-32, сшивающийся только с модифицированными остатками G, инвариантен в первичной структуре eRF1, и его ключевая роль в процессе распознавания стоп-кодона вместе с NIKS-и YxCxxxF-мотивами была недавно показана с помощью сайт-направленного мутагенеза (Wang et al., 2010).

### **2.3. Сопоставление данных по аффинной модификации eRF1 аналогами мРНК с моделями терминационных комплексов 80S рибосом**

Для сопоставления с результатами по сшивкам использовали модели терминационных комплексов 80S рибосом, полученные ранее (Воробьев и

Киселев, 2007; 2008). Шаблоном для построения этих моделей служила кристаллографическая структура комплекса 70S рибосомы с мРНК и тРНК в А- и Р-участках (2HGP). К этому шаблону подгоняли структуру eRF1 так, чтобы его конформация оптимально соответствовала рибосомной полости для связывания молекулы тРНК в А-участке. В результате были получены две альтернативные модели (M1 и M2) расположения eRF1 относительно стоп-кодона мРНК, различающиеся степенью деформации структуры eRF1 относительно конформации свободного фактора. Данные по шшивкам сопоставляли с моделью M1, в которой конформация eRF1 была близка к L-образной тРНК-подобной конформации, с расстоянием между NIKS- и GGQ-мотивами 76Å, а между GGQ-мотивом и стоп-кодоном 74Å, что соответствует расстоянию между 3'-концом и антикодоном тРНК. Чтобы найти аминокислотные остатки eRF1, соседствующие с атомом N3 перфторфенилазидогруппы аналогов мРНК, линкерные группировки были добавлены к соответствующим нуклеотидам мРНК в этой модели, при этом учитывали те аминокислотные остатки, которые находились на расстоянии не более 10 Å от атома N3 (табл. 2). Оказалось, что результаты по шшивкам eRF1 с аналогами мРНК, несущими перфторфенилазидогруппу на остатках G, хорошо согласуются с этой моделью, в отличие от результатов, полученных для аналогов, несущих такую же группу на остатках А и модифицировавших район



**Рис. 13.** Модель взаимного расположения мРНК, тРНК<sup>Phe</sup> в Р-участке и eRF1 в А-участке в 80S рибосомном терминационном комплексе. (А) Общий вид. Сахарофосфатный остов мРНК представлен трубкой цвета хаки, тРНК<sup>Phe</sup> в Р-участке рибосомы – трубкой темно-синего цвета; eRF1 изображен в виде спирали (N-, M-, и C-домены фактора выделены, соответственно, красным, зеленым и зелено-голубым цветами). (Б) Увеличенное детальное изображение части комплекса, включающей N-домен eRF1 и мРНК, представленное таким же образом, что и общий вид. NIKS-, GT-мотивы и остаток Arg28 показаны в виде “стержней”, YxCxxxF-мотив изображен в виде широкой “ленты”. Отмечены спирали α2 и α3 eRF1. Нуклеотиды стоп-кодона в А-участке рибосомы (в положениях +4, +5 и +6) изображены в виде “стержней” и обведены розовой областью. Стрелками указаны предполагаемые направления движения фрагментов N-домена.

YxCxxxF-мотива, а не NIKS-мотива, шшивку с которым ожидали на основании модели M1 (табл. 2). Такое несоответствие можно легко объяснить, если предположить, что N-домен eRF1 подвергается конформационным перестройкам, при которых спирали α2 и α3 и GT-мотив движутся в противоположных направлениях от центральной оси N-домена; при этом положения остатка R28 и района YxCxxxF-мотива остаются неизменными (рис.

13). Такие перестройки, по-видимому, позволяют остаткам аденина стоп-сигнала глубже проникать в “карман” в N-домене eRF1, где происходит их связывание с фактором, что может объяснить различия в наборе мишеней модификации eRF1 аналогами мРНК со сшивающей группой на остатках А и G в стоп-сигнале.

Таким образом, остатки аденозина и гуанозина стоп-сигнала мРНК распознаются разными конформациями N-домена eRF1, главным отличием между которыми является расположение пуринов стоп-сигнала относительно универсально консервативного дипептида 31-GT-32 eRF1. Этот дипептид соседствует или даже контактирует с остатками гуанозина, но удален от остатков аденозина. Данные, полученные в настоящей работе, объясняют способность eRF1 распознавать все три стоп-кодона и дают новое представление о механизмах распознавания стоп-кодона у эукариот, которые до настоящего времени остаются неизвестными, поскольку методы РСА и крио-ЭМ пока не были применены для изучения терминационных комплексов 80S рибосом.

## ВЫВОДЫ

С использованием набора аналогов мРНК – производных олигорибонуклеотидов, несущих перфторфенилазидогруппу в заданном положении, впервые установлены фрагменты одного из ключевых компонентов декодирующего центра рибосом млекопитающих – белка S15 и фактора терминации трансляции eRF1, соседствующие в составе специфических комплексов с кодоном мРНК в декодирующем центре и нуклеотидом, прилегающим к нему с 3'-стороны.

- Специфичный для эукариот и архей декапептид 131-PGIGATHSSR-140 рибосомного белка S15 соседствует с мРНК в процессах элонгации и терминации трансляции; при этом первый нуклеотид кодона в А-участке в большей степени сближен с этим декапептидом, чем другие нуклеотиды.
- Три отдельных высококонсервативных района eRF1 в его N-домене (NIKS, YxCxxxF и GTx) оказываются сближенными со стоп-кодоном и друг с другом в А-участке терминационного комплекса 80S рибосом.
- Остатки гуанозина во втором, третьем или четвертом положении стоп-сигнала соседствуют с мотивом 31-GTx-33 eRF1, а остатки аденозина в тех же положениях – с районом 121-131, включающим YxCxxxF-мотив, что соответствует разным конформациям N-домена eRF1.
- Фосфат на 3'-конце четвертого нуклеотида стоп-сигнала сближен с участком 67-73 eRF1 в районе NIKS-мотива, содержащем аминокислотные остатки, участвующие в дискриминации пуринов стоп-сигнала, тогда как 3'-концевой фосфат на третьем нуклеотиде стоп-кодона соседствует с неконсервативным фрагментом 26-28 eRF1, который также сближен с остатком аденозина в четвертом положении терминирующего тетраплета.
- Остатки аденозина и гуанозина стоп-сигнала мРНК распознаются разными конформациями N-домена eRF1, различающимися ориентацией абсолютно консервативного дипептида 31-GT-32 относительно этих остатков, что может обеспечивать механизмы, позволяющие eRF1 узнавать все три стоп-кодона.

## Результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Хайрулина Ю.С., Молотков М.В, Булыгин К.Н., Грайфер Д.М., Веняминова А.Г., Карпова Г.Г. С-концевой фрагмент рибосомного белка S15 расположен в декодирующем центре рибосомы человека // Молекуляр. биология. – 2008. – Т. 42. – С. 306-313.
2. Khairulina J., Graifer D., Bulygin K., Ven'yaminova A., Frolova L., Karpova G. Eukaryote-specific motif of ribosomal protein S15 neighbors A site codon during elongation and termination of translation // Biochimie. – 2010. – V. 92. – P. 820-825.
3. Bulygin K.N., Khairulina Yu.S., Kolosov P.M., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Vorobjev Yu.N., Frolova L.Yu., Kisselev L.L., Karpova G.G. Three distinct peptides from the N domain of translation termination factor eRF1 surround stop codon in the ribosome // RNA. – 2010. – V. 16. – P. 1902–1914.
4. Bulygin K.N., Khairulina Yu.S., Kolosov P.M., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Vorobjev Yu.N., Frolova L.Yu., Karpova G.G. Adenine and guanine recognition of stop codon is mediated by different N domain conformations of translation termination factor eRF1 // Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39. – P. 7134–7146.