

*На правах рукописи*

МАЛЫГИН АЛЕКСЕЙ АРКАДЬЕВИЧ

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА С  
РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ РНК**

03.01.04 – биохимия



Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
доктора химических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный консультант:

**Карпова Галина Георгиевна**, д.х.н., профессор,  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, зав. лабораторией

Официальные оппоненты:

**Кочетов Алексей Владимирович**, д.б.н., чл.-корр. РАН,  
ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»,  
зам. директора по научной работе

**Кочетков Сергей Николаевич**, д.х.н., чл.-корр. РАН,  
профессор,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
зав. лабораторией

**Сергиев Пётр Владимирович**, д.х.н.  
Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, профессор кафедры химии природных  
соединений химического факультета

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится « 16 » ноября 2018 г. в 12<sup>00</sup> часов  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе  
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
по адресу: 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы и степень её разработанности.**

Синтез белков на рибосомах является заключительной стадией реализации генетической информации, заложенной в белок-кодирующих генах всех живых организмов. В ходе этого процесса, трансляции, осуществляется точное декодирование последовательности нуклеотидов мРНК и катализ образования пептидных связей в синтезируемом полипептиде в точном соответствии с генетическим кодом. Центральный участник трансляции – рибосома – представляет собой динамичный мультикомпонентный РНК-белковый комплекс, состоящий из специфичных рибосомных РНК (рРНК) и рибосомных белков, которые вместе формируют две рибосомные субчастицы – большую и малую. От согласованной работы этого комплекса и других участников процесса трансляции зависит в конечном итоге жизнеспособность клетки.

Поскольку рибосомы присущи всем клеточным организмам, и основной их функцией является синтез белков, то у всех рибосом имеются одинаковые (консервативные) черты в их строении. Однако чем в более дальнем эволюционном родстве находятся эти организмы, тем больше отличий в строении их рибосом. В настоящее время принято классифицировать рибосомы по трём типам согласно трём доменам жизни: рибосомы эубактерий и архей (прокариотические рибосомы) и рибосомы эукариот. Рибосомы разных типов сильно отличаются друг от друга, причём рибосомы эукариот устроены наиболее сложным образом. Субчастицы эукариотических рибосом в дополнение к белкам, имеющим эубактериальные гомологи, содержат большой набор эукариот/архей-специфичных белков, а в белках, гомологичных эубактериальным рибосомным белкам, часто встречаются протяжённые районы, специфичные для архей и эукариот. Кроме того, эукариотические рРНК имеют большую длину, чем прокариотические рРНК, и включают участки, не имеющие гомологии в рРНК прокариот (т.н. сегменты экспансии). Всё это делает субчастицы эукариотических рибосом более крупными по сравнению с субчастицами рибосом прокариот, что отражается на коэффициентах их седиментации: 60S и 40S для соответственно большой и малой субчастиц 80S рибосомы эукариот (50S и 30S у большой и малой субчастиц 70S рибосомы прокариот).

Процесс сборки рибосомных субчастиц имеет огромное значение для клетки, поскольку от безошибочности этого процесса зависит эффективность и точность трансляции. В клетках прокариот этот процесс контролируют несколько десятков различных белков, а у эукариот за сборку рибосомных субчастиц отвечает свыше двух сотен участников. Тем не менее, ещё в 60-ых годах прошлого века в группе Номуры было показано, что 30S субчастицы рибосом *Escherichia coli* могут быть собраны *in vitro* из отдельных рибосомных белков и 16S рРНК без участия дополнительных факторов (Nomura *et al.*, 1968). Позднее, подобным образом удалось осуществить сборку активных субчастиц рибосом других представителей эубактерий и архей. Эти работы

существенно расширили методологический арсенал исследователей, что сыграло впоследствии неоценимую роль в изучении структурно-функциональной топографии субчастиц рибосом прокариот и в расшифровке их структуры на атомарном уровне. Однако, несмотря на усилия многих лабораторий, попытки собрать *in vitro* активные субчастицы эукариотических рибосом не увенчались успехом, что, вероятно, обусловлено сложностью самого процесса сборки, требующего участия большого числа вспомогательных факторов. В связи с этим представляло интерес определить рибосомные белки, образующие кор (от англ. core – ядро, сердцевина) 40S субчастицы, и изучить особенности РНК-белковых взаимодействий, происходящих при сборке её отдельных морфологических районов и формировании структуры 60S субчастицы вблизи каталитического центра, используя индивидуальные рибосомные белки и фрагменты рРНК, содержащие участки связывания этих белков. Функциональная роль рибосомных белков не ограничивается их участием в трансляции в качестве конститутивных компонентов рибосом. Известно множество примеров вовлечения рибосомных белков в клеточные процессы, не сопряжённые с трансляцией мРНК на рибосомах. В этом плане прокариотические рибосомные белки также изучены лучше: например, хорошо известна их способность контролировать свой биосинтез через регуляцию уровня трансляции соответствующих оперонов, осуществляемую по принципу обратной связи. У эукариот процесс экспрессии генов более сложен, чем у прокариот, и включает стадию сплайсинга первичного транскрипта, на которой происходит вырезание незначительных последовательностей (интронов) и лигирование последовательностей, составляющих зрелую мРНК (экзонов). Учитывая высокое сродство рибосомных белков к разным видам РНК, а также тот факт, что данные белки присутствуют в клеточном ядре, где происходит сплайсинг и созревание мРНК, можно полагать, что отдельные рибосомные белки вовлекаются в процесс регуляции экспрессии генов на этой стадии. О существовании таких регуляторных функций у рибосомных белков высших эукариот можно судить из того, что уровень экспрессии генов отдельных рибосомных белков в клетках при канцерогенезе или развитии аутоиммунных заболеваний существенно отличается от такового в норме. Очевидно, что нарушение уровня экспрессии генов рибосомных белков должно катастрофическим образом сказываться также на процессе сборки рибосомных субчастиц в клетке и, как следствие, на её общей трансляционной активности. На момент начала настоящей работы возможность регуляции биосинтеза рибосомных белков эукариот на стадии сплайсинга их пре-мРНК была показана для дрожжей, но оставалось неизвестным, существует ли подобный тип регуляции экспрессии генов рибосомных белков у высших эукариот, чей процесс сплайсинга более сложен, чем у низших эукариот.

Известно, что геномные РНК (гРНК) многих вирусов могут инициировать свою трансляцию по механизму, принципиально отличающемуся от механизма инициации трансляции экзистированных клеточных мРНК, благодаря наличию в

5'-нетранслируемых областях этих гРНК особых структурных элементов, так называемых IRES (от англ. Internal Ribosome Entry Site – внутренний участок входа рибосомы). Так, IRES-элемент гРНК одного из опаснейших патогенов человека – вируса гепатита С (ВГС) способен прочно связываться с 40S субчастицей рибосомы в отсутствие факторов инициации трансляции. В результате этого связывания стартовый AUG-кодон гРНК ВГС оказывается помещённым вблизи района 40S субчастицы, соответствующего участку, где происходит взаимодействие этого кодона с инициаторной тРНК. На основании данных по сшивкам IRES ВГС с 40S субчастицами рибосом сложилось мнение, что в связывание с IRES при инициации трансляции гРНК ВГС на 40S субчастицах вовлекаются исключительно рибосомные белки. Однако структурные основы молекулярного механизма IRES-зависимой инициации трансляции, обеспечивающего синтез вирусного полипротеина в обход регуляторных механизмов клетки, оставались неизвестными. Кроме того, отсутствовала информация об устройстве на 40S субчастице фрагмента кодирующей части гРНК ВГС, входящего в состав IRES, хотя и существовала точка зрения, что в бинарном комплексе IRES ВГС с 40S субчастицей этот фрагмент фиксируется стабильно в мРНК-связывающем канале.

Таким образом, представлялось актуальным изучение особенностей взаимодействия рибосомных белков человека с разными видами РНК и их роли в регуляции экспрессии собственных генов и инициации трансляции гРНК ВГС.

#### **Цель и задачи исследования.**

Целью настоящей работы являлось изучение структурных особенностей взаимодействий рибосомных белков человека с разными видами РНК, лежащих в основе различных клеточных процессов, не связанных непосредственно с трансляцией клеточных мРНК.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи.

1. Разработать платформу для получения функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека и на её основе получить репрезентативный набор таких белков для изучения их взаимодействий с различными видами РНК.

2. Определить устойчивость 40S субчастиц рибосом человека к действию высоких концентраций моновалентных катионов, и установить порядок диссоциации рибосомных белков из 40S субчастиц.

3. Изучить взаимодействие рибосомных белков человека с 18S рРНК с использованием рекомбинантных рибосомных белков и фрагментов 18S рРНК, содержащих участки связывания этих белков, и выявить характерные особенности таких взаимодействий.

4. Установить роль посттрансляционной модификации – гидроксирования рибосомного белка uL2 в структуре 60S субчастицы рибосомы человека.

5. Реконструировать на основе РНК-транскрипта, соответствующего большому 3'-концевому домену 18S рРНК, и суммарного белка 40S субчастицы большую морфологическую часть 40S субчастицы рибосомы человека – голову.

6. Определить структурные элементы 40S субчастицы рибосомы человека, взаимодействующие с IRES ВГС в составе соответствующего бинарного комплекса, и предложить молекулярный механизм, обеспечивающий узнавание инициаторного кодона AUG IRES ВГС в этом комплексе Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> без участия факторов инициации.

7. Изучить взаимодействие рибосомных белков человека с кодирующими их пре-мРНК, и выяснить, способны ли эти белки регулировать экспрессию собственных генов на стадии сплайсинга их пре-мРНК.

### **Научная новизна.**

Настоящая работа представляет собой первое комплексное исследование структурно-функциональных свойств рибосомных белков человека, проявляемых ими в различных клеточных процессах, помимо непосредственно трансляции клеточных мРНК. В ходе выполнения исследования была разработана платформа для получения очищенных рекомбинантных рибосомных белков человека, предложены методы их ренатурации и получен представительный набор таких белков. С помощью полученных рекомбинантных белков и РНК-транскриптов, соответствующих различным районам 18S и 28S рРНК, установлен ряд характерных особенностей связывания рибосомных белков человека с этими рРНК и выявлена роль гидроксирования белка uL2 в формировании рибосомного каталитического центра. Впервые выполнена сборка большой морфологической части 40S субчастицы, головы, из суммарного белка субчастицы и РНК-транскрипта, соответствующего большому 3'-концевому домену 18S рРНК. Установлен ряд белков 40S субчастицы рибосомы человека, вовлеченных в её связывание с IRES ВГС, а также впервые получены структурные данные, позволившие предложить молекулярный механизм IRES-зависимой инициации трансляции гРНК ВГС. Использование рекомбинантных белков и РНК-транскриптов, соответствующих фрагментам их пре-мРНК, позволило открыть новый способ регуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на уровне сплайсинга, в основе которого лежит принцип обратной связи. Таким образом, в настоящей работе впервые установлены структурные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с разными видами РНК при функционировании в процессах, связанных со сборкой 40S и 60S субчастиц рибосом, инициацией трансляции гРНК ВГС и регуляцией экспрессии их генов, и показана роль конкретных рибосомных белков в этих процессах.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Результаты настоящего исследования существенно расширили представление о функциональных свойствах рибосомных белков высших

эукариот и внесли весомый вклад в понимание их роли в биогенезе рибосом. Универсальность разработанной платформы для получения рекомбинантных рибосомных белков млекопитающих сделала возможным использование этих белков в различных направлениях исследований. Полученные данные об особенностях РНК-белковых взаимодействий рибосомных белков с фрагментами 18S рРНК выявили существенные отличия в характере связывания рибосомных белков млекопитающих (и, скорее всего, рибосомных белков эукариот в целом) с рРНК от аналогичного процесса у эубактерий. Эти данные позволили показать, что, несмотря на значительные видимые сходства в связывании гомологичных рибосомных белков эубактерий и человека с соответствующими участками рРНК, эукариот-специфичные фрагменты рибосомных белков вносят значительные коррективы в это связывание. Выявленные особенности взаимодействия рибосомных белков с рРНК, включая роль гидроксирования белка uL2 в формировании рибосомного каталитического центра, и продемонстрированная на примере головы 40S субчастицы принципиальная возможность сборки из отдельных компонентов рибонуклеопротеида, соответствующего её отдельному морфологическому району, могут иметь значение при определении ключевых аспектов клеточных механизмов, обеспечивающих сборку рибосомных субчастиц. Открытие нового способа авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на уровне сплайсинга их пре-мРНК расширило список известных функций этих белков, проявляемых ими вне рибосомных субчастиц, что, несомненно, может оказаться полезным для понимания молекулярных механизмов патологий, связанных с дисфункцией рибосомных белков.

Результаты работы, касающиеся выявления белков 40S субчастицы рибосомы человека, участвующих в связывании IRES ВГС, существенно дополнили данные по сайт-направленному сшиванию IRES ВГС с 40S субчастицей и структурные данные низкого разрешения для рибосомных комплексов IRES. Всё это позволило точно локализовать сайт связывания IRES на 40S субчастице и определить участки IRES, контактирующие с конкретными рибосомными белками. Показано, что один из этих белков, рибосомный белок uS2, вносит существенный вклад в связывание IRES ВГС с 40S субчастицей. Впервые продемонстрированы прямые контакты IRES с 18S рРНК, способствующие позиционированию домена II IRES вблизи рибосомного белка uS7, и выявлен конформационный переход 18S рРНК в районе G1639, ответственном за селекцию Met-тРНК<sup>Met</sup>. Полученные данные проливают свет на молекулярный механизм IRES-зависимой инициации трансляции гРНК ВГС, обеспечивающий селекцию Met-тРНК<sup>Met</sup> 40S субчастицами, связанными с IRES, без участия факторов инициации, ответственных за узнавание старт-кодона. С помощью сайт-направленного сшивания IRES ВГС с 40S субчастицами установлено, что триплет IRES с 3'-стороны от старт-кодона AUG взаимодействует с рибосомным белком uS19, специфическим компонентом декодирующего центра, только в незначительной доле бинарных комплексов. Эти данные показывают, что в большей части

таких комплексов кодирующая часть IRES не фиксируется в мРНК-связывающем канале так, как канонические мРНК в комплексах с кодон-антикодоновым взаимодействием в рибосомном Р-сайте. Все данные, полученные с IRES ВГС, могут быть распространены на гРНК других вирусов, чьи IRES-элементы имеют вторичную структуру, аналогичную структуре IRES ВГС. Знание молекулярного механизма IRES-зависимой инициации трансляции гРНК ВГС открывает новые возможности в разработке инновационных подходов к созданию противовирусных препаратов, направленных на борьбу с ВГС и подобными ему вирусами.

Таким образом, полученные в ходе исследования знания могут иметь принципиальное значение для понимания структурных аспектов фундаментальных процессов, протекающих в клетках с участием рибосомных белков, включая процесс трансляции гРНК ВГС белоксинтезирующей системой человека.

### **Методология и методы исследования.**

В работе был использован широкий набор современных подходов к изучению белков и РНК-белковых комплексов, включающих молекулярно-биологические, химические и физические методы исследований. Рекомбинантные рибосомные белки человека и их мутантные формы были получены в системе клеток *E. coli*, а фолдинг белков был определён с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Фрагменты рРНК получали путём Т7-транскрипции ДНК-матриц, сконструированных с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Структура РНК в составе рибонуклеопротеидных комплексов была исследована с помощью зондирования с использованием набора химических и ферментативных зондов различной специфичности. Белки 40S субчастицы рибосомы человека, участвующие в связывании с IRES ВГС, были выявлены с применением подхода, основанного на флуоресцентном мечении экспонированных остатков лизина в белках N-гидроксисукцинимидным производным красителя Су3. Белки 40S субчастицы, соседствующие с нуклеотидными остатками домена IV IRES ВГС, были установлены с использованием производных IRES ВГС, несущих фотоактивируемую группу в заданном положении, которые были получены с помощью метода, основанного на комплементарно-адресованном алкилировании РНК. Кроме того, в работе были использованы методы биоинформатики для анализа структур РНК и белков.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Платформа, разработанная для получения рекомбинантных рибосомных белков человека в клетках *E. coli*, позволяет нарабатывать белки, пригодные для структурно-функциональных исследований.
2. Малая субчастица рибосомы млекопитающих более чувствительна к концентрации моновалентных катионов, чем соответствующая субчастица рибосомы эубактерий и отличается от неё порядком диссоциации белков.

3. Рибосомные белки человека, взаимодействуя с рРНК, стабилизируют её структуру в участках связывания, действуя подобно ионам  $Mg^{2+}$  или как “молекулярная скрепка”; участки связывания универсальных рибосомных белков на рРНК, в целом, эволюционно консервативны, а эукариот/архей-специфичные фрагменты белков либо образуют дополнительные контакты с рРНК, либо остаются свободными.

4. Гидроксильная группа на остатке His216 рибосомного белка uL2 человека играет роль в формировании структуры каталитического центра рибосомы, способствуя конформационным перестройкам соответствующего региона 28S рРНК при его связывании с гидроксильрованным белком, которые делают структуру этого региона такой, как в зрелых 60S субчастицах.

5. Отщепление морфологической части 40S субчастицы рибосомы – головы от остальной её части и возможность реконструкции соответствующего рибонуклеопротеида, удовлетворительно коррелирующего с головой по белковому составу и экспонированности РНК, являются свидетельствами независимого характера сборки этой части 40S субчастицы при её биосинтезе.

6. В связывание IRES ВГС 40S субчастицами рибосомы вовлекаются белки eS1, uS2, eS10, uS11, eS26 и eS27, а также апикальная часть шпильки h26 18S рРНК, взаимодействие которой с субдоменом III<sub>d</sub> IRES способствует uS7-опосредованным структурным перестройкам 18S рРНК в районе, ответственном за связывание инициаторной тРНК в Р-сайте. Эти перестройки лежат в основе механизма, обеспечивающего узнавание старт-кодона IRES инициаторной тРНК в отсутствие факторов инициации трансляции.

7. Рибосомные белки человека способны связываться с различными консенсусными участками сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК, и тем самым ингибировать вырезание этого интрона. Эта способность даёт возможность рибосомным белкам обеспечивать авторегуляцию экспрессии собственных генов на стадии сплайсинга. Узнавание рибосомными белками участков связывания на разных видах РНК происходит по принципу структурной мимикрии.

### **Степень достоверности и апробация результатов.**

По результатам работы опубликовано 26 статей в ведущих рецензируемых российских и зарубежных изданиях. Результаты работы в виде устных и стендовых докладов были представлены автором лично на российских и международных конференциях и конгрессах: III-й Съезд биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), International conference “Chemical and Biological Problems of Proteomics” (Novosibirsk, 2004), International Conference on Chemical Biology (Novosibirsk, 2005), 8-я Энгельгардтовская международная конференции по молекулярной биологии (Сергиев Посад, 2006), Международная конференция “Физико-химическая биология” посвящённая 80-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, 2006), XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Москва, 2007), III Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Пушино, 2007) , IV съезд Российского общества

биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), ARCUS Workshop “Development of new tools for fundamental research in health and disease” (Strasbourg, 2008), V-th International symposium “Supramolecular systems in chemistry and biology” (Kiev, 2009), Международная конференция “Supramolecular Chemistry for Material and Life Sciences” (Novosibirsk, 2010), Конференция “Физико-химическая биология”, посвященная 85-летию акад. Д.Г.Кнорре (Novosibirsk, 2011) и Международная конференция РТВ-2012 (Новосибирск, 2012).

#### **Личный вклад автора.**

Результаты исследований были получены лично автором, либо сотрудниками под его непосредственным руководством преимущественно в рамках выполнения проектов Российского фонда фундаментальных исследований, в которых автор являлся руководителем. В совместных работах ему принадлежит ключевая роль в постановке задач, выборе методов исследования, разработке методик и гипотез, анализе литературных источников и интерпретации полученных результатов. Он принимал непосредственное участие в планировании и организации проведения экспериментов, систематизации и обобщении экспериментальных данных, подготовке публикаций, а также представлял результаты исследований на научных конференциях.

#### **Структура и объём диссертации.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 283 страницах, содержит 86 рисунков и 6 таблиц. Библиография содержит 369 литературных источников.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

#### **1. Получение функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека и изучение их вторичной структуры**

При выборе системы для получения рекомбинантных рибосомных белков человека принимали во внимание скорость этого процесса и его стоимость. Поэтому окончательный выбор был сделан в пользу экспрессии в клетках *E. coli*, которые можно легко и быстро наращивать в больших количествах, ДНК-конструкций на основе плазмидного вектора рЕТ-15b, позволяющего получать рекомбинантные белки со встроенной N-концевой гексагистидиновой последовательностью (His6-tag), удобной для их очистки с помощью аффинной хроматографии. С использованием такой системы был получен набор высокоочищенных препаратов рекомбинантных рибосомных белков uS3, uS7, eS10, eS19, eS26, uS15, uS9, uS13, uS2, eS28 и uL2 (S3, S5, S10, S19, S26, S13, S16, S18, SA, S28 и L8 соответственно согласно номенклатуре, существовавшей до 2014 г.) человека и делеционные формы некоторых из них.

Для получения рекомбинантного рибосомного белка клетки *E. coli* штамма

BL21(DE3) трансформировали соответствующей плазмидой, и отдельный клон наращивали в питательной среде до поздней логарифмической фазы клеточного роста. Индукцию синтеза рекомбинантного белка запускали добавлением в клеточную культуру ИПТГ. Как правило, через 3 ч после индукции количество рекомбинантного белка ожидаемого размера в клетках достигало максимального уровня и составляло ~10% от общего количества клеточного белка. Анализ показал, что полученные таким способом рекомбинантные рибосомные белки накапливаются в клетках преимущественно (свыше 90%) в виде телец включения. Поэтому процедура очистки рекомбинантных рибосомных белков включала стадии выделения телец включения, их солюбилизации в хаотропном агенте и аффинную хроматографию белка на смоле, содержащей хелатированные ионы никеля. Этот способ позволял получать практически гомогенный препарат белка с чистотой до 95-98% (Рис. 1).

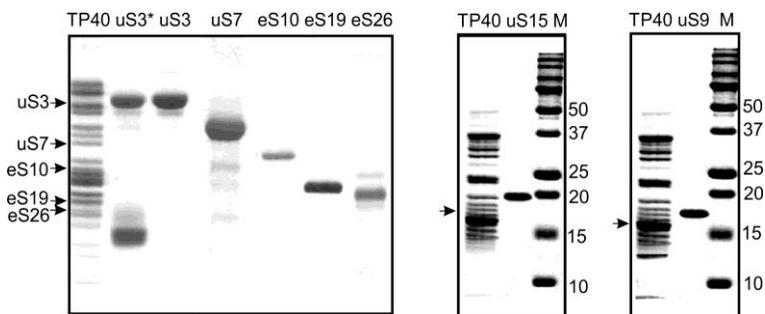


Рисунок 1. Очистка рекомбинантных рибосомных белков человека. Анализ препаратов очищенных рекомбинантных белков (отмечены сверху) электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. Дорожки TP40 – суммарный белок 40S субчастиц рибосом. Стрелками слева от панелей отмечены положения в дорожках TP40 рибосомных белков, соответствующих анализируемым рекомбинантным белкам. Дорожки М – белковый маркер; справа от этих дорожек указаны массы маркерных белков в кДа.

Поскольку белок в препарате, полученном из телец включения, находился в денатурированном состоянии, требовалась отдельная стадия восстановления его нативной структуры (рефолдинга). Два подхода, часто используемых для рефолдинга белков, были оптимизированы для рекомбинантных рибосомных белков человека. Рефолдинг больших количеств белков (от 100 мкг) проводили методом ступенчатого диализа против буферного раствора с высокой ионной силой, а для небольших количеств белка применяли метод быстрого разбавления в воде с последующим переводом в буферный раствор. Оба метода давали примерно одинаковые результаты.

С помощью спектроскопии КД была изучена вторичная структура трёх рекомбинантных рибосомных белков: uS15, uS9 и uS13. Основываясь на полученных данных, было установлено, что ренатурированные рибосомные

белки человека обладают выраженной пространственной структурой. Учитывая, что содержание элементов вторичной структуры в рекомбинантных рибосомных белках uS15, uS9 и uS13 человека, в общем, соответствует содержанию этих элементов в структурах гомологичных белков прокариот, можно заключить, что фолдинг этих белков соответствует фолдингу их природных форм. Кроме того, частично удалось предсказать содержание вторичной структуры в эукариот/архей-специфичных областях некоторых из этих белков.

## 2. Структурные основы взаимодействий рибосомных белков с 18S рРНК и её фрагментами

### 2.1. Порядок диссоциации белков из 40S субчастицы рибосомы человека под действием моновалентных катионов

Для диссоциации 40S субчастиц рибосом, выделенных из плаценты человека, был применён метод центрифугирования субчастиц в линейном градиенте плотности сахарозы, содержащем градиент концентрации LiCl. В ходе миграции из области низкой концентрации соли в область более высокой концентрации белки диссоциировали из 40S субчастиц и оставались в тех же областях градиента, где произошла их диссоциация, из-за их низкого коэффициента седиментации и слабой диффузии в градиенте сахарозы. После центрифугирования содержимое пробирок фракционировали; белки во фракциях, анализировали с помощью электрофореза в 14%-ном SDS-ПААГ, что позволило идентифицировать большинство белков (Рис. 2).

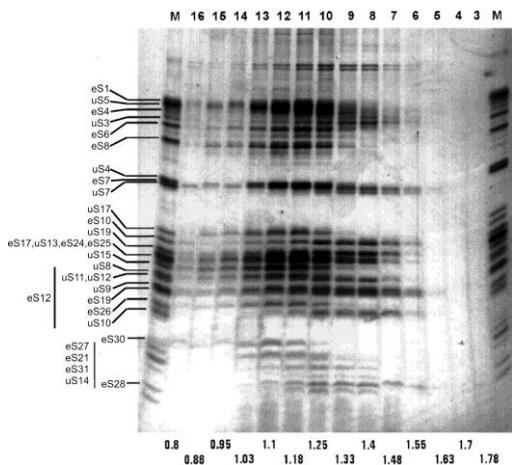


Рисунок 2. Анализ содержания белков во фракциях сахарозного градиента. Белки, из фракций градиента, соответствующих номерам дорожек, разделены электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. Показан гель, окрашенный Кумасси R250. Дорожки М, суммарный белок 40S субчастиц. Положения индивидуальных белков, определенные в отдельных экспериментах, показаны слева. Общая концентрация соли (LiCl и KCl) во фракциях указана внизу.

Представляло интерес сравнить чувствительность к действию высокой концентрации одновалентных катионов малых субчастиц рибосом эубактерий (*E. coli*) и человека. Ранее было показано, что диссоциация большинства белков из 30S субчастиц происходит ступенчато (а не плавно, как для 40S

субчастиц рибосом человека) в широком диапазоне концентраций LiCl (1 М – 3.5 М), приводя к образованию частиц, дефицитных по содержанию отдельных белков (Homann and Nierhaus, 1971). Таким образом, 40S субчастицы рибосом млекопитающих оказались гораздо более чувствительными к высокой концентрации моновалентных катионов, чем 30S субчастицы рибосом эубактерий. Диссоциация всех белков из 40S субчастиц происходит в более узком интервале концентраций соли и без образования промежуточных частиц с характерными наборами белков, причём порядок диссоциации рибосомных белков из 40S субчастиц не соответствует порядку диссоциации белков из 30S субчастиц.

## 2.2 Отщепление головы 40S субчастицы от тела и картирование рибосомного белка eS28 на голове субчастицы

Ранее, на 30S субчастице эубактериальной рибосомы было показано, что её голова может быть отделена от тела расщеплением 16S рРНК в районах между спиралью h27/h28 и h28/h44 с помощью РНКазы Н (Ulitin *et al.*, 1997). Аналогичный подход был применён к 40S субчастицам рибосом человека в настоящей работе. Фрагмент 40S субчастицы, образовавшийся в результате такого гидролиза, выделяли из реакционной смеси центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, собирая частицы с коэффициентом седиментации от 10S до 15S. РНК, выделенная из таких частиц, по длине практически точно соответствовала большому 3'-концевому домену 18S рРНК (480 н.) (Рис. 3). Таким образом, можно было утверждать, что выделенные частицы соответствуют части 40S субчастицы, составляющей её голову.

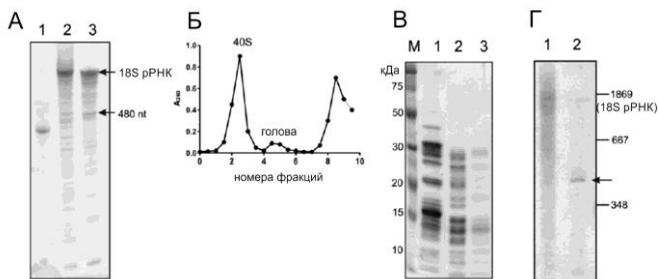


Рис. 3. Расщепление 40S рибосомных субчастиц человека с помощью РНКазы Н. (А) Анализ РНК, выделенной из 40S субчастиц до (2) и после (3) обработки РНКазой Н, электрофорезом в 4%-ном ПААГ;

РНК-транскрипт длиной 400 н. (1) приведён в качестве маркера. (Б) Разделение продуктов расщепления 40S субчастиц РНКазой Н в сахарозном градиенте. Пики нерасщеплённых 40S субчастиц и частиц, соответствующих голове, подписаны. (В) Анализ белков, выделенных из необработанных 40S субчастиц (1) и из фракций сахарозного градиента, подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. (Г) Анализ РНК, выделенной из фракций сахарозного градиента подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в денатурирующем 4%-ном ПААГ. Стрелка указывает на продукт расщепления, соответствующий большому 3'-домену 18S рРНК. Положения маркерных РНК подписаны справа.

Анализ белкового содержания частиц, соответствующих голове 40S субчастицы, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии был выполнен только для белков с молекулярной массой ниже 20 кДа. Анализ спектров, полученных для белков, выделенных из частиц, соответствующих голове 40S субчастицы, и белков исходных 40S субчастиц, показал, что в голове 40S субчастицы расположены рибосомные белки uS11, uS9 и uS14, у которых есть зубактериальные гомологи, и эукариот/архей-специфичные белки eS19 и eS28.

Таким образом, впервые было установлено, что один из самых маленьких белков 40S субчастицы рибосомы человека, белок eS28 ( $M_w=7883$  Да), входит в состав её головы – большой морфологической части этой субчастицы. То, что голова 40S субчастицы может быть отщеплена от её тела, позволяет заключить, что данная часть является структурно независимой.

#### **2.4 Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS2 человека с 40S субчастицами, дефицитными по белку uS2, и картирование участка связывания эукариот-специфичного С-концевого домена белка uS2 на 40S субчастице**

Известно, что уровень белка uS2 в 40S рибосомных субчастицах изменяется в зависимости от степени трансляционной активности клеток. В препаратах 40S субчастиц рибосом из послеродовой плаценты содержание нативного белка uS2 варьировало в пределах 15-50%.

Способность рекомбинантного рибосомного белка uS2 связываться с 40S субчастицами, дефицитными по белку uS2, проверяли путем титрования 40S субчастиц с 15%-ным содержанием uS2 в буфере с 2.5 mM  $Mg^{2+}$  данным рекомбинантным белком. В параллельных экспериментах проводили титрование 40S субчастиц из этого же препарата рекомбинантными белками, соответствующими мутантным формам рибосомного белка uS2, лишённым 48-ми и 109-ти аминокислотных остатков с N- и С- концов соответственно (uS2 $\Delta$ N и uS2 $\Delta$ C), что позволяло определить область связывания в рибосомном белке uS2. Субчастицы после инкубирования с рекомбинантными белками выделяли из смеси центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (10-30%).

Установлено, что делеция 48-звенного N-концевого участка белка uS2, не отражалась на его способности связываться с 40S субчастицами, а при делеции STD, напротив, белок терял способность к этому связыванию. Чтобы проверить участие STD рибосомного белка uS2 в его ассоциации с 40S субчастицей рибосомы и найти последовательность, ответственную за это связывание, были синтезированы мутантные формы этого белка, последовательно усечённые с С-конца на 17, 33 и 60 остатков. Все белки, кроме формы с делецией 60-ти остатков, были способны связываться с 40S частицей. Эти данные свидетельствовали о том, что аминокислотная последовательность в районе 236-262 рибосомного белка uS2, является необходимой для связывания этого белка с 40S субчастицей.

Чтобы найти участок 18S рРНК, отвечающий за формирование сайта связывания STD рибосомного белка uS2 в голове 40S субчастицы, был

использован метод гидроксил-радикального футпринтинга 18S рРНК в 40S субчастицах, дефицитных по белку uS2, которые были насыщены рекомбинантным белком – полноразмерным uS2 или его усеченной формой. Нуклеотиды, защищаемые от расщепления гидроксил-радикалами, были найдены только в спиралях h35 и h40 18S рРНК. Нуклеотиды U1462-A1465 расположены в апикальной части шпильки h40, в то время как нуклеотиды A1452-A1454 лежат в её базальной части на расстоянии одного витка спирали. Все найденные футпринты являлись специфичными для рекомбинантных белков, способных связываться с 40S субчастицами. Это давало основание полагать, что именно CTD, отвечающий за связывание uS2 с 40S субчастицами, контактирует со шпилькой h40 18S рРНК.

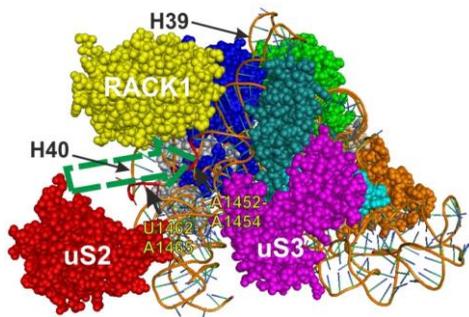


Рис. 4. Позиционирование CTD белка uS2 на 40S субчастице рибосомы. Приведена модель головы 40S субчастицы рибосомы *T. lanuginosus* (PDB 3JYV). Нуклеотиды в шпильке h40, соответствующие футпринтам, характерным для CTD белка uS2, отмечены стрелками. Зеленая стрелка указывает направление предлагаемого расположения CTD белка uS2.

Данные по определению нуклеотидов 18S рРНК, контактирующих с CTD белка uS2, позволили впервые предположить местонахождение этого домена белка на голове 40S субчастицы рибосомы грибов *Thermomyces lanuginosus*, разрешение структуры которой на тот момент было самым большим среди доступных структур рибосом эукариот. Так, CTD белка uS2 простирается, по-видимому, от консервативной части этого белка в направлении шпильки h40, и затем по её краю, обращённому наружу субчастицы, так что аминокислоты в области 236-262 CTD образуют контакты со шпилькой h40 (Рис. 4). В настоящее время стали доступны крио-ЭМ структуры рибосом различных млекопитающих, включая человека, однако структура CTD белка uS2 в них по-прежнему не разрешена, поэтому вопрос о контактах CTD белка uS2 с соседними белками остаётся открытым.

## 2.5 Взаимодействие рибосомных белков uS7, uS15, uS9 и uS13 человека с фрагментами 18S рРНК, содержащими участки их связывания

Для изучения связывания рибосомного белка uS7 человека с 18S рРНК был выбран фрагмент 1203-1236/1521-1698 (3Dm), принадлежащий её большому 3'-концевому домену и соответствующий району 16S рРНК, содержащему участок связывания рибосомного белка uS7 эубактерий. Примечательно, что фрагмент 3Dm включал районы 18S рРНК, обладающие высокой

филогенетической консервативностью. Величина  $Ka$  для рекомбинантного рибосомного белка uS7 при связывании с 3Dm в буфере, содержащем 4 мМ  $Mg^{2+}$ , составляла  $(2.5 \pm 0.5) \times 10^8 M^{-1}$ , тогда как при связывании этого же РНК-фрагмента с другими рекомбинантными рибосомными белками человека, eS10 и eS26, величины  $Ka$  были более чем на порядок ниже, что свидетельствовало о специфичности связывания рибосомного белка uS7 с данным фрагментом.

Для определения участков фрагмента 3Dm, вовлекаемых в формирование области связывания белка uS7, использован метод ферментативного футпринтинга с помощью РНКаз T1 и T2. Белок uS7 наиболее сильно защищает от действия РНКаз последовательности нуклеотидов A1532-G1535 и G1598-A1601, образующие часть внутренней петли фрагмента, прилегающую к основанию шпильки h41, а также фосфодизфирную связь между G1224 и U1225 в спирали h29. Кроме этого, были найдены 4 участка с более слабой защитой. Результаты ферментативного футпринтинга комплекса рекомбинантного рибосомного белка uS7 человека с фрагментом 3Dm в целом согласуются с данными, полученными ранее при изучении взаимодействия рибосомного белка uS7 эубактерий с 16S рРНК. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что сайт связывания рибосомного белка uS7 человека на 18S рРНК имеет строение, в целом аналогичное строению сайта связывания его эубактериального гомолога на 16S рРНК.

Фрагмент 3Dm оказался также полезным для изучения взаимодействия с этой РНК другого рибосомного белка человека – uS9. Этот белок специфично связывался с фрагментом 3Dm, проявляя к нему довольно высокое сродство ( $Ka = (5 \pm 0.6) \times 10^6 M^{-1}$ ); как и в случае с белком uS7, связывание проводили в буфере, содержащем 4 мМ  $Mg^{2+}$ . С помощью ферментативного и химического футпринтинга в присутствии рибосомного белка uS9 наблюдали изменение доступности отдельных нуклеотидов фрагмента 3Dm в спиральях h30, h41, и h43. Сравнение данных футпринтинга с данными по расположению эубактериального гомолога этого белка в 30S рибосомной субчастице, а также с современными структурами эукариотических рибосом, позволило сделать заключение о сходстве молекулярных контактов рибосомного белка uS9 с рРНК малых субчастиц рибосом у эубактерий и человека. Примечательно, что при совместном связывании рекомбинантных рибосомных белков uS7 и uS9 человека с фрагментом 3Dm имел место кооперативный эффект, а данные футпринтинга свидетельствовали о значительной взаимной стабилизации структуры участков связывания этих белков на РНК. Возможно, подобный эффект данные белки оказывают на структуру 18S рРНК и при сборке 40S субчастиц рибосом *in vivo*.

Для связывания с рекомбинантным рибосомным белком uS13 использован РНК-транскрипт, включающий область 1201-1272/1510-1698 18S рРНК (фрагмент 3Dc), которая соответствует району 16S рРНК, содержащему сайт связывания гомологичного белка. Чтобы уменьшить структурную жёсткость РНК, связывание проводили в буфере, содержащем низкую (2 мМ) концентрацию  $Mg^{2+}$ . Примечательно, что рибосомный белок uS13 был

способен связываться с фрагментом 3Dc самостоятельно, без помощи каких-либо других рибосомных белков, тогда как для специфического связывания с 16S рРНК его эубактериального гомолога требуются белки bS20 и uS7.

С помощью гидроксил-радикального футпринтинга показано, что связывание рибосомного белка uS13 влияет на конформацию фрагмента 3Dc, делая его структуру более компактной, что проявляется в виде выраженных футпринтов в области спиралей h30, h31, h41-h43 и эта компактизация способствует фиксации 3Dc в комплексе с белком. Кроме того, оказалось, что фрагмент 3Dc при связывании с рибосомным белком uS13 претерпевает существенные перестройки, позволяющие спиральям h29/h30 и h41-h43 располагаться вдоль друг друга так, как они уложены в 40S субчастице рибосомы.

Следует отметить, что рибосомным белкам семейства uS13, свойственна существенная структурная гибкость. Так, согласно структуре белка uS13 в составе 30S субчастицы, в нём практически отсутствуют внутримолекулярные полярные связи, способные соединять его N-концевую, центральную и C-концевую части, которые, вследствие этого, в изолированном белке должны обладать значительной конформационной подвижностью. Однако в 30S субчастице рибосом эубактерий, где эти части белка контактируют с 16S рРНК, они фиксированы. Так же структурно фиксированы в составе 40S рибосомной субчастицы соответствующие части рибосомного белка uS13 у млекопитающих. Учитывая, что структура фрагмента 3Dc в комплексе с рибосомным белком uS13 также становится более жёсткой, чем у изолированного 3Dc, можно заключить, что при связывании этого белка с 18S рРНК происходит взаимная фиксация структуры в их участках связывания. Таким образом, рибосомный белок uS13 действует как уникальная молекулярная скрепка, фиксирующая центральную часть большого 3'-концевого домена 18S рРНК.

Эукариотические (как и архейные) представители семейства рибосомных белков uS15 значительно длиннее своих эубактериальных гомологов и обладают длинным N-концевым районом, не имеющим выраженной гомологии у эубактерий, а C-концевая часть у белков этого семейства, напротив, характеризуется высокой степенью гомологии. Для изучения связывания рибосомного белка uS15 человека с 18S рРНК был получен РНК-транскрипт (фрагмент 18SCD), соответствующий части центрального домена 18S рРНК. В нём отсутствовали участки, соответствующие шпильке h21 и сегменту экспансии ES6 18S рРНК. Эти районы структурно обособлены от основной части центрального домена 18S рРНК, поэтому их отсутствие не должно было влиять на формирование пространственной структуры фрагмента 18SCD, в котором указанные районы были замещены двумя остатками цитозина.

Данные по футпринтингу фрагмента 18SCD в присутствии рибосомного белка uS15 человека, как оказалось, хорошо согласуются с результатами, полученными ранее при изучении связывания белка uS15 *T. thermophilus* с фрагментом центрального домена 16S рРНК (Serganov *et al.*, 1996). Можно

заклучить, что основные мотивы рибосомного белка uS15 человека, обеспечивающие его связывание с 18S рРНК, консервативны и соответствуют мотивам его эубактериального гомолога, формирующим контакты с нуклеотидными остатками 16S рРНК в малой субчастице рибосомы эубактерий. Специфичная для эукариот и архей N-концевая часть uS15 контактирует с 18S рРНК слабо. Основная роль этой части, по-видимому, состоит в поддержании конформационной стабильности белка и в формировании контактов с рибосомными белками, соседствующими с ней в 40S субчастице, и, возможно, с лигандами, которые связываются с рибосомой в процессе биосинтеза белка.

При концентрации ионов  $Mg^{2+}$  до 2 мМ степень связывания белка uS15 с РНК практически не изменялась и составляла примерно 90%, в то время как дальнейшее повышение концентрации ионов  $Mg^{2+}$  приводило к существенному понижению степени связывания (до 35% при 20 мМ концентрации). Оказалось, что повышение концентрации  $Mg^{2+}$  приводит к изменению доступности для атаки гидроксил-радикалами у трёх районов рибозофосфатного остова фрагмента 18SCD, расположенных в спиралях h20 и h22. Данные о доступности нуклеотидов 18SCD для атаки гидроксил-радикалами в присутствии высоких концентраций ионов  $Mg^{2+}$  (10-20 мМ) соответствуют структуре аналогичного участка 18S рРНК в 40S субчастице. Что касается слабой доступности спирали h22 гидроксил-радикалам при низкой концентрации ионов  $Mg^{2+}$  (0.5–2 мМ), то этот участок, скорее всего, был закрыт большой бороздкой базальной части спирали h24 (Рис. 5). Таким образом, относительное расположение спиралей h20, h22, h23 и h24 в центральном домене 18S рРНК в районе участка связывания uS15 зависит от концентрации ионов  $Mg^{2+}$ .

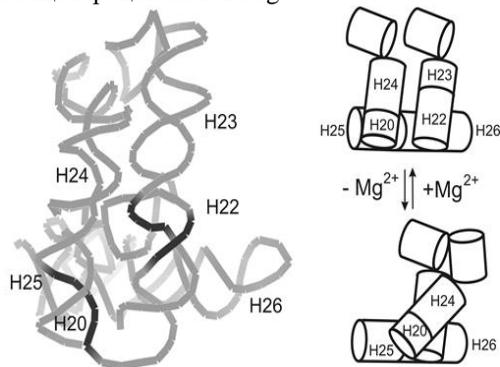


Рис. 5. Сопоставление результатов зондирования структуры 18SCD со структурой центрального домена 18S рРНК в 40S субчастице рибосомы дрожжей согласно данным РСА. Слева – фрагмент структуры 18S рРНК в 40S субчастице, соответствующий 18SCD; участки, доступность которых гидроксил-радикалам изменялась с повышением концентрации  $Mg^{2+}$ , выделены черным. Справа – изменения ориентации спиралей в 18SCD в зависимости от концентрации  $Mg^{2+}$ .

Можно заключить, что ионы  $Mg^{2+}$  при высокой концентрации вызывают конформационные перестройки в 18S рРНК, затрагивающие участок связывания белка uS15 в ее центральном домене. По-видимому, насыщение координированными ионами  $Mg^{2+}$  центрального домена 18S рРНК приводит к

стабилизации его структуры в той же конформации, что и связывание uS15, и это хорошо объясняет понижение сродства uS15 к фрагменту 18SCD при высоких концентрациях ионов  $Mg^{2+}$ .

В целом, можно отметить, что хотя в связывании гомологичных рибосомных белков эубактерий и человека с соответствующими участками рРНК малой субчастицы имеются очевидные сходства, эукариот-специфичные фрагменты у некоторых белков человека вносят значительные коррективы в это связывание.

## **2.6 Роль гидроксирования рибосомного белка uL2 в поддержании функционально активной структуры 60S субчастицы рибосомы человека**

Индивидуальный природный белок uL2 (uL2n) был получен с помощью ВЭЖХ суммарного белка 60S субчастиц рибосом из плаценты человека. Анализ трипсинового гидролизата uL2n с помощью масс-спектрологии MALDI TOF показал наличие в его составе пептида с молекулярной массой 2753.37 Да, соответствующей массе пептида 201-226 с дополнительной гидроксильной группой, которая должна находиться на остатке His216. Соответствующий немодифицированный рекомбинантный белок (uL2r) был получен из клеток *E. coli*, трансформированных соответствующей плазмидной конструкцией. Для исследования был выбран сегмент домена V, где расположены спирали H73, H80-82, H88 и H90, с которыми взаимодействует С-концевой район белка uL2, включающий гидроксированный остаток His216, а также спирали H74, H75 и H93, участвующие в формировании каталитического центра рибосомы. РНК длиной 266 н. (фрагмент 28S/DV), моделирующая указанный сегмент домена V 28S рРНК, была получена с помощью T7-транскрипции ПЦР-продукта, в котором участки, соответствующие вышеупомянутым спиральям, были объединены.

Чтобы выяснить, участвует ли гидроксильная группа белка uL2 в его связывании с 28S рРНК, и определить сайты в РНК, на структуру которых могла бы влиять эта группа, был выполнен химический футпринтинг фрагмента 28S/DV в комплексах с белками uL2n и uL2r. В качестве зондов были использованы диметилсульфат (DMS), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодимид мето-р-толуолсульфонат (CMCT), бензоилцианид и гидроксил-радикалы. Сравнение результатов футпринтинга, полученных для изолированного фрагмента 28S/DV и для его комплексов с белками uL2n или uL2r, выявило четыре дискретные области, в которых нуклеотиды изменяли свою доступность зондам при связывании РНК с белками. Наиболее выраженные изменения происходили в регионах I и особенно III, которые на вторичной структуре 28S/DV расположены, в основном, в районе спиралей H90 и H93. Регион I, а именно C4447 в его составе, проявлял повышенную доступность к гидроксил-радикалам при связывании фрагмента 28S/DV с белком uL2n, но не с белком uL2r; при этом ни один из белков не экранировал данный регион от модификации. Оба белка защищали регион II (односпиральный участок 4520-4529) от атаки зондами,

специфичными к азотистым основаниям. В регионе III (нуклеотиды 4531-4533) наблюдали резкое усиление доступности рибозы U4532 к гидроксил-радикалам при связывании белка uL2n, и умеренную защиту от модификации DMS и СМСТ, детектируемую для обоих белков. Наконец, в регионе IV (нуклеотиды 4534-4548) были обнаружены защиты от гидроксил-радикалов в комплексе с белком uL2n, но не с uL2r, тогда как оба белка защищали нуклеотиды 4544-4548 от модификации DMS.

Примечательно, что регион IV почти полностью совпадает с участком спирали H93, контактирующим с белком uL2 в 60S субчастице, и поэтому футпринты от белка uL2n в этой области отражают связывание белка uL2 с 28S рРНК. Это означает, что гидроксирование uL2 по остатку His216 необходимо для распознавания спирали H93 С-концевым районом белка. Большое количество защит от атаки гидроксил-радикалами по сравнению с незначительным количеством защит от модификации DMS, наблюдаемых в регионе IV, указывает на то, что сахарофосфатный остов РНК участвует в связывании белка в большей степени, чем основания нуклеотидов.

Защиты в спирали H93 от гидроксил-радикалов, наблюдаемые в комплексе фрагмента 28S/DV с белком uL2n, но не uL2r, свидетельствуют о том, что контакты вершины С-концевой петли uL2 с этой спиралью реализуются благодаря присутствию гидроксильной группы на остатке His216 в белке uL2. В рибосоме млекопитающих для поддержания правильной архитектуры этой области, гидроксильная группа в His216 могла бы быть вовлечена либо в связывание с рРНК, либо во внутримолекулярные взаимодействия в белке.

Анализируя атомарную структуру 60S субчастицы рибосомы человека (PDB 3J3B и 3J3F), можно предсказать, что атом О гидроксильной группы His216 расположен относительно атома С $\beta$  так, что он образует водородную связь между водородом группы ОН и атомом N $\delta$  в остатке His218. Эта водородная связь предотвращает вращение остатка His216 вокруг связи С $\alpha$ -С $\beta$ , позволяя имидазольному кольцу образовывать водородные в большой бороздке спирали H93 (Рис. 6). Таким образом, анализ структуры 60S субчастицы показал, что роль гидроксильной группы на остатке His216 заключается в поддержании правильной фиксации верхушки С-концевой петли белка uL2 на спирали H93 28S рРНК, а не в контакте с 28S рРНК.

Можно заключить, что гидроксильная группа в аминокислотном остатке His216, расположенном в верхушке С-концевой петли рибосомного белка uL2 человека, стабилизирует конформацию этой части белка, делая её подходящей для связывания со спиралью H93 28S рРНК во время сборки 60S субчастицы рибосомы. Это связывание, в свою очередь, индуцирует структурные перестройки нуклеотидов C4447 и U4532 28S рРНК, что позволяет универсально консервативным нуклеотидам C3909, C4397 и U4531 обеспечивать каталитическую активность ПТЦ в зрелой рибосоме. Таким образом, можно думать, что гидроксирование His216 в uL2 играет критическую роль в поддержании надлежащей архитектуры ПТЦ в рибосомах млекопитающих.

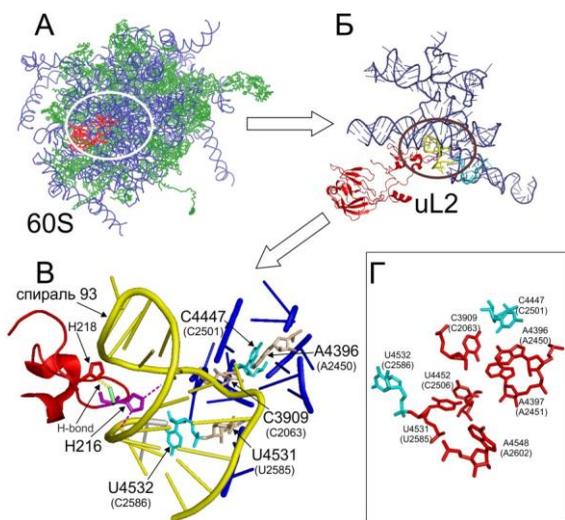


Рис. 6. Пространственная структура 60S субчастицы рибосомы человека в районе остатка His216 белка uL2. (А) 60S субчастица (PDB 3J3B and 3J3F) с указанием рРНК (синий), рибосомных белков (зелёный) и белка uL2 (красный цвет). (Б) Увеличенный вид области, обведённой на панели А. (В) Увеличенный вид области, обведённой на панели Б, где верхушка С-концевой петли белка uL2 отмечена красным. Спираль Н93, остаток His216 и остаток U4532

указаны стрелками. Водородные связи между H216 и Н93 показаны пунктиром. Предполагаемое расположение гидроксильной группы на остатке His216 отмечено зелёной линией, а предполагаемая водородная связь между этой группой и атомом Nδ в остатке His218 изображена жёлтым пунктиром и отмечена стрелкой. (Г) Расположение нуклеотидных остатков, формирующих внутреннее ядро пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) (отмечены красным), и нуклеотидов, увеличивающих свою доступность гидроксил-радикалам в комплексе фрагмента 28S/DV с белком uL2n (отмечены голубым).

## 2.8 Связывание суммарного белка 40S субчастицы рибосомы человека с большим 3'-концевым доменом 18S рРНК

Для выяснения возможности реконструирования *in vitro* рибонуклеопротеида, соответствующего голове субчастицы, было изучено взаимодействие суммарного белка 40S субчастицы с РНК-транскриптом, моделирующим этот домен, и определены те белки, которые могут селективно связываться с ним. РНК-транскрипт (фрагмент 18S3DM) длиной 498 н. содержал область, соответствующую фрагменту 1203-1698 18S рРНК человека. Суммарный белок 40S субчастиц рибосом (TP40) был получен депротеинизацией 40S субчастиц, выделенных их плаценты человека, с использованием высокой концентрации соли (2 M LiCl).

Для связывания с TP40 использовали биотинилированную по 3'-концу РНК, иммобилизованную на стрептавидин-агарозе. Белки, связавшиеся с иммобилизованной РНК, были элюированы раствором, содержащим SDS, и разделены электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS. Анализ электрофоретического паттерна выявил довольно большой набор рибосомных белков, связавшихся с фрагментом 18S3DM. Оказалось, что из 33 белков 40S

субчастицы 21 белок способен связываться с данным фрагментом. Это – 15 белков (uS5, uS3, uS7, eS10, eS12, uS13, uS9, eS17, uS13, eS19, uS10, eS25, eS26, uS14 и eS31), контактирующих с большим 3'-концевым доменом 18S рРНК в 40S субчастице, и 6 белков (eS1, eS7, eS8, uS15, uS11 и uS8), не имеющих таких контактов. В полученном наборе, однако, отсутствовали три белка (RACK1, uS2 и eS28), контактирующих с вышеуказанным регионом 18S рРНК в 40S частице. Эти результаты показали, что хотя большинство рибосомных белков, способных связываться с РНК-транскриптом 18S3DM, специфичны для большого 3'-концевого домена 18S рРНК, доля рибосомных белков 40S субчастицы, связывающихся с этой РНК неспецифично, относительно велика.

Чтобы проверить, не являлось ли использование иммобилизованной РНК причиной неспецифического связывания рибосомных белков, TP40 и фрагмент 18S3DM, меченный <sup>32</sup>P, взятые в эквимольном соотношении, были инкубированы в буферном растворе. Анализ рибосомных белков, связавшихся с фрагментом 18S3DM в растворе, с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF выявил, что этот паттерн, в дополнение к белку uS2, содержит также белок eS28, специфичный к 3'- домену 18S рРНК. Кроме того, оказалось, что он не включает неспецифичного белка uS11, наблюдавшегося в паттерне, полученном с иммобилизованным фрагментом 18S3DM. Специфичность связывания рибосомных белков с фрагментом 18S3DM в растворе была заметно выше, чем с иммобилизованным РНК-фрагментом, хотя общий выход РНК-белкового комплекса был ниже из-за значительной агрегации комплекса. Таким образом, рибонуклеопротеид, соответствующий голове 40S субчастицы рибосомы человека, может быть реконструирован из РНК-транскрипта, соответствующего большому 3'-концевому домену 18S рРНК, и суммарного белка 40S субчастицы.

### **3 Роль рибосомных белков 40S субчастицы в инициации трансляции геномной РНК ВГС**

#### **3.1 Рибосомные белки 40S субчастицы, участвующие в связывании IRES ВГС через экспонированные остатки лизина**

Геномная РНК ВГС, несёт в составе своей 5'-НТО IRES-элемент, который обеспечивает инициацию трансляции этой РНК в обход классического механизма сканирования, реализуемого на клеточных мРНК. На момент начала исследований была неизвестна конкретная роль рибосомных белков и их структурных элементов в связывании IRES ВГС с 40S субчастицей рибосомы, и было неясно, какой вклад вносит 18S рРНК в это связывание.

В составе рибосомных белков человека присутствует большое число положительно заряженных аминокислотных остатков, в том числе лизина. Эти остатки часто оказываются вовлечёнными в связывание с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом РНК. Остаток лизина несёт аминогруппу, чья доступность может быть определена с помощью зондирования N-гидроксисукцинимидными (NHS) эфирами. В связи с этим для модификации первичных аминогрупп рибосомных белков экспонированных в

40S субчастицах, изолированных и в составе их комплексов с IRES ВГС и его делеционными мутантами, был использован флуоресцентный реагент NHS-Cy3. Для выявления белков, участвующих в связывании IRES ВГС, проводили сравнение величин эффективности их модификации NHS-Cy3 в 40S субчастицах в отсутствие и в присутствии IRES ВГС или его делеционных мутантов. Такой подход методологически похож на футпринтинг РНК в составе рибонуклеопротеиновых комплексов с помощью химических зондов, поэтому его можно назвать белковым футпринтингом.

Для определения белков 40S субчастиц, взаимодействующих с IRES ВГС, использовали три РНК-транскрипта, один из которых соответствовал IRES ВГС, а два других являлись его укороченными формами. В частности, РНК-транскрипт IRES<sub>40-372</sub> (полноразмерный IRES) содержал участок геномной РНК ВГС с 40-го по 372-ой н., который включает большой фрагмент 5'-НТО и начальную часть открытой рамки считывания (ORF, от англ. open reading frame) (последовательность 345-372) сразу после AUG кодона (положения 342-344). РНК-транскрипт IRES<sub>ΔORF</sub> соответствовал фрагменту IRES ВГС, в котором отсутствовала последовательность 345-372, включающая часть ORF. Эта последовательность, хотя и не вносит заметного вклада в связывание IRES ВГС с 40S субчастицами, является необходимой для его функциональной активности. Наконец, РНК-транскрипт IRES<sub>ΔDIIΔORF</sub> соответствовал фрагменту IRES ВГС, где вместе с ORF отсутствовал домен II (вклад которого в сродство IRES ВГС к 40S субчастицам также несущественен) (Рис.7).



Рис. 7. Схематическое представление вторичных структур IRES ВГС и его укороченных форм, использованных в работе.

Связывание всех трёх РНК-транскриптов приводило к снижению интенсивности флуоресценции полосы в верхней части геля (Рис. 8), которое было наиболее выраженным в случае IRES<sub>ΔORF</sub> (около 15%). Масс-спектрометрический анализ белкового состава этой полосы геля выявил наличие в ней рибосомных белков u5 (S2), e1 (S3a) и RACK1. Из этих белков только e1 контактирует с IRES ВГС (Laletina *et al.*, 2006). То есть, IRES-зависимое снижение интенсивности флуоресценции полосы в верхней части геля обусловлено его связыванием с белком e1 40S субчастицы.

В случае комплекса 40S субчастиц с IRES<sub>40-372</sub>, происходило заметное снижение интенсивности флуоресценции белковой полосы в средней части геля, составлявшее около 22%, тогда как для комплексов с остальными РНК-транскриптами, в которых отсутствовала область, соответствующая ORF, интенсивность этой полосы не изменялась (Рис. 8). Эта полоса в геле

соответствует белку eS10 (S10) и то, что интенсивность её флуоресценции сохранялась в комплексах с фрагментами IRES ВГС, лишёнными ORF, свидетельствовало о вовлечении этого белка в связывание ORF. Наконец, в нижней части геля находилась белковая полоса, интенсивность флуоресценции которой в изолированных 40S субчастицах хотя и была небольшой, тем не менее, в присутствии каждого из РНК-транскриптов снижалась более, чем на 70% (Рис. 8). Масс-спектрометрический анализ белков в этой полосе геля показал наличие в ней только белка eS27. Сильная защита рибосомного белка eS27 от модификации в присутствии каждого из трёх РНК-транскриптов, в том числе IRES<sub>ΔPIAORF</sub>, указывает на то, что данный белок связывается только с доменом III IRES ВГС и что большая часть экспонированных остатков лизина в этом белке участвует в связывании. Таким образом, с помощью метода белкового футпринтинга с использованием флуоресцентного реагента, специфичного к NH<sub>2</sub>-группам, удалось установить, что остатки лизина рибосомных белков eS1, eS10 и eS27 (S3a, S10 и S27), у которых нет зубактериальных гомологов, принимают участие в связывании IRES ВГС на 40S субчастице рибосомы человека.

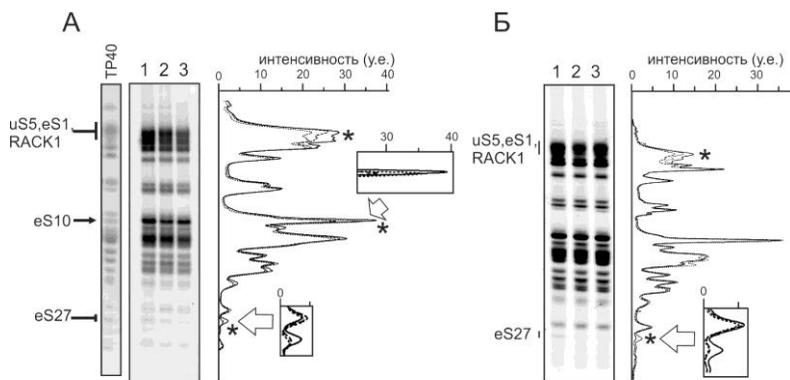


Рис. 8. Флуоресцентное мечение 40S субчастиц в бинарных комплексах с IRES ВГС и его фрагментами. Панель А – флуореграмма геля после разделения рибосомных белков в 14%-ном ПААГ в присутствии SDS, выделенных из 40S субчастиц, свободных и находящихся в комплексе с IRES<sub>40-372</sub> или IRES<sub>ΔORF</sub> после обработки реагентом NHS-Cy3 (дорожки 1, 2 и 3 соответственно). Дорожка TR40 – белки 40S субчастицы, разделённые в том же геле и окрашенные Кумасси R250. Положения белков в геле отмечены слева. Справа – денситометрические профили дорожек 1 (сплошная линия), 2 (длинный пунктир) и 3 (короткий пунктир). Звёздочками отмечены пики, интенсивность которых изменяется. Панель Б – флуореграмма геля после разделения в 14%-ном ПААГ в присутствии SDS рибосомных белков, выделенных из 40S субчастиц, свободных и ассоциированных с IRES<sub>ΔORF</sub> или IRES<sub>ΔPIAORF</sub> (дорожки 1, 2 и 3 соответственно), после обработки реагентом NHS-Cy3. Справа, денситометрические профили дорожек 1 (сплошная линия), 2 (длинный пунктир) и 3 (короткий пунктир).

### 3.2 Молекулярный механизм IRES-зависимой инициации трансляции ВГС и ВГС-подобных вирусов

В опытах по гидроксил-радикальному футпринтингу для комплексов 40S субчастиц с усеченными формами IRES были обнаружены два участка в 18S рРНК, которые изменяли свою доступность атаке гидроксил-радикалами по сравнению со свободными 40S субчастицами (Рис. 9). Первая область (A1113-C1118) расположена в апикальной петле сегмента экспансии 7 (ES7S) в шпильке h26 18S рРНК. Эта область, доступная для атаки гидроксил-радикалами в свободных 40S субчастицах, была практически полностью экранирована в их комплексах с IRES<sub>ΔORF</sub> и IRES<sub>ΔDIIΔORF</sub>. Вторая область (G1638-A1640), наоборот, была слабо доступна для гидроксил-радикалов в свободных 40S субчастицах, но её доступность сильно повышалась в присутствии IRES<sub>ΔORF</sub>. Этот эффект был особенно заметным на G1639. В комплексе 40S субчастиц с IRES<sub>ΔDIIΔORF</sub> увеличение доступности нуклеотидов в этой области было слабовыраженным.

В присутствии IRES<sub>ΔORF</sub> доступность остатков C1118, C1117 и C1116 в спирали h26 18S рРНК для модификации DMS оказалась сниженной. Учитывая, что в апикальной петле субдомена III<sub>d</sub> IRES ВГС, который критически важен для связывания IRES с 40S субчастицей, расположен триплет GGG, можно было заключить, что триплет CCC спирали h26 18S рРНК образует комплементарную пару с триплетом GGG субдомена III<sub>d</sub> в комплексе 40S субчастиц с IRES ВГС. Чтобы прояснить причину сильного увеличения доступности 18S рРНК в районе G1639 в комплексах 40S субчастиц с IRES<sub>ΔORF</sub>, гидроксил-радикальный футпринтинг был выполнен для комплексов 40S субчастиц с РНК-транскриптами IRES<sub>40-372</sub> и IRES<sub>ΔDII</sub>. Удаление из структуры IRES ВГС домена II или домена IV, содержащего инициаторный кодон AUG, приводило к резкому снижению доступности гидроксил-радикалам нуклеотидов G1638-A1640.

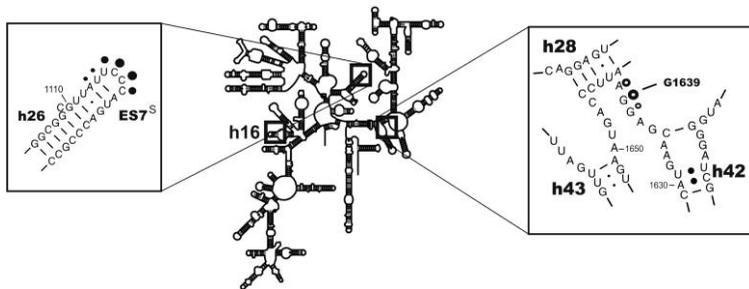


Рис. 9. Зондирование структуры 18S рРНК в составе комплекса 40S субчастиц рибосом человека с IRES<sub>ΔORF</sub>, IRES<sub>ΔDIIΔORF</sub> или IRES<sub>40-372</sub> с помощью гидроксил-радикалов. Положения нуклеотидов, защищаемых от атаки гидроксил-радикалами (чёрные точки), и нуклеотидов, увеличивающих свою доступность гидроксил-радикалам (светлые точки), отмечены на вторичной структуре 18S рРНК человека.

Основываясь на этих данных, можно было заключить, что структурные изменения в районе нуклеотида G1639 18S рРНК, происходящие в 40S субчастице при связывании IRES ВГС, обеспечиваются взаимодействием двух удалённых друг от друга районов IRES-элемента, а именно домена II и инициаторного кодона AUG в домене IV. Поскольку домены II и IV IRES ВГС не контактируют между собой в области рибосомного мРНК-связывающего центра, можно было предположить, что их взаимодействие на 40S субчастице происходит с участием какого-то посредника, то есть аллостерически. На роль такого посредника больше всего подходил расположенный в этом центре рибосомный белок uS7, с которым, как известно, взаимодействует домен II IRES ВГС в бинарном комплексе с 40S субчастицей. Однако белок uS7 не участвует в формировании рибосомного Р-сайта, где устанавливается старт-кодон AUG IRES ВГС, поэтому, скорее всего, с этим белком взаимодействуют нуклеотиды, прилегающие к нему с 5'-стороны.

Нуклеотид G1639 18S рРНК является универсальным нуклеотидом в рРНК малых субчастиц рибосом. В 16S рРНК *E. coli* соответствующий ему нуклеотид участвует в IF3-зависимой селекции инициаторной тРНК в Р-сайте рибосомы (Lancaster and Noller, 2005). Установлено, что он вместе с соседним нуклеотидом выступает в качестве своеобразных ворот, которые, будучи закрытыми, предотвращают транслокацию тРНК из Р-сайта в Е-сайт и которые открываются при повороте головы малой субчастицы (Selmer *et al.*, 2006). Поэтому полученные данные о структурных изменениях в районе G1639 18S рРНК, позволяют предположить, что данный конформационный переход необходим также при IRES-опосредованной инициации трансляции, в отсутствие факторов инициации, участвующих в выборе и распознавании AUG-кодона. Примечательно, что с районом G1639 перекрывается область связывания неструктурированных N- и C-концевых участков фактора инициации eIF1a на 40S субчастице и что оба этих участка сильно стимулируют связывание тройного комплекса eIF2•Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>•GTP с 40S субчастицей (Yu *et al.*, 2009). Поэтому, можно считать, что при IRES-опосредованной инициации трансляции гРНК ВГС совместное действие доменов II и IV IRES функционально заменяет действие факторов eIF1a и eIF1 при канонической инициации трансляции путем конформационной перестройки 18S рРНК в области G1639.

Таким образом, полученные данные позволили предложить молекулярный механизм, обеспечивающий способность 40S субчастицы в комплексе с IRES ВГС, узнавать Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> без участия факторов инициации eIF1 и eIF1a, обеспечивающих узнавание старт-кодона при канонической инициации трансляции. В соответствии с этим механизмом, на начальном этапе инициации трансляции геномной РНК ВГС происходит связывание её IRES с 40S субчастицей через взаимодействие домена III с рибосомными белками вблизи участка выхода мРНК. Далее, это связывание дополнительно стабилизируется взаимодействием между апикальными петлями субдомена

III<sup>d</sup> IRES и шпильки h26 18S рРНК. Такая стабилизация приводит к тому, что домен II IRES оказывается расположенным на голове 40S субчастицы и образует контакт с рибосомным белком uS7, который, в свою очередь, позволяет домену IV IRES расплестись и поместить часть ORF в мРНК-связывающем канале. Как только AUG-кодон оказывается в области декодирования, происходит конформационный переход 18S рРНК в области G1639, опосредованный взаимодействием рибосомного белка uS7 с апикальной петлей домена II и нуклеотидами, фланкирующими инициаторный кодон с 5'-стороны, что активирует 40S субчастицу, делая её способной к последующей дискриминации инициаторной тРНК и её закреплению Р-участке. Далее происходит узнавание AUG-кодона инициаторной тРНК и фиксация рамки считывания геномной РНК ВГС в мРНК-связывающем канале, что завершает образование 48S предынициаторного комплекса.

### **3.3 Расположение нуклеотидов, фланкирующих старт-кодон ORF IRES ВГС, в бинарном комплексе IRES ВГС с 40S субчастицами рибосом**

Чтобы прояснить вопрос о расположении на 40S субчастице области IRES ВГС, включающей окружение инициаторного кодона AUG, была проведена аффинная модификация 40S субчастиц с использованием производных IRES, содержащих сшивающую перфторарилазидную группу на нуклеотидных остатках в положении  $-3$  (IRES(-3)) или  $+4/+5$  (IRES(+4/+5)) относительно остатка аденозина стартового кодона AUG. Следует заметить, что в IRES(+4/+5) место расположения фотоактивируемой группы определено с точностью до двух нуклеотидных остатков, то есть остаток, несущий сшивающую группу мог находиться в одном из указанных положений. Сшивки <sup>32</sup>P-меченых производных IRES ВГС с 40S субчастицами получали, облучая соответствующие смеси мягким УФ-светом. После облучения 40S субчастицы были разрушены и обработаны РНКазой T1. Идентификацию сшитых белков проводили после разделения полученных смесей электрофорезом в SDS-ПААГ с последующим переносом белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану и её радиоавтографированием, учитывая сдвиги, которые им придают ковалентно присоединенные олигорибонуклеотиды. Установлено, что в бинарном комплексе с 40S субчастицами IRES(-3) сшивался с белками uS11 и eS26, а IRES(+4/5) – с белком uS19, при этом выход сшивки с IRES(+4/5) был ниже, по крайней мере, на порядок, чем с IRES(-3). Следовательно, можно было заключить, что нуклеотидный остаток в положении  $-3$  IRES ВГС соседствует с белками uS11 и eS26, а в положении  $+4/+5$  – с белком uS19. Однако доля комплексов, где остаток в положении  $+4/+5$  оказывается вблизи uS19, значительно ниже, по сравнению с долей комплексов, где нуклеотид в положении  $-3$  расположен вблизи белков uS11 и eS26. Более того, она составляет всего лишь около 0.3% от уровня сшивки с uS19, наблюдавшегося ранее в комплексах с аналогами канонических мРНК.

Результаты сшивок, полученных с IRES(-3), согласуются с данными крио-ЭМ комплексов IRES ВГС с 80S рибосомой (Yamamoto *et al.*, 2015). С другой

стороны, вблизи нуклеотидов в положении  $-3$  находится белок uS7 (Demeshkina *et al.*, 2003). Следовательно, можно заключить, что в бинарном комплексе IRES ВГС с 40S субчастицей расположение нуклеотида, занимающего позицию  $-3$ , отличается от расположения нуклеотида в той же позиции в рибосомных комплексах с аналогами канонических мРНК, образованных с участием тРНК. Это отличие, скорее всего, обусловлено кодон-антикодоновым взаимодействием в Р-сайте, которое отсутствует в бинарном комплексе IRES ВГС с 40S субчастицей. Что касается белка uS19, то хорошо известно, что в рибосомных комплексах с тРНК в Р-сайте (Khairulina *et al.*, 2010) С-концевой фрагмент этого белка взаимодействует с кодоном мРНК в А-сайте, хотя роль этого фрагмента в трансляции пока остается неясной.

Из полученных данных следует, что при связывании IRES ВГС с 40S субчастицами, предшествующем образованию 48S прединициаторных комплексов, ORF IRES занимает правильное положение в мРНК-связывающем канале только в очень небольшой доле соответствующих бинарных комплексов (Рис. 10). Можно заключить, что правильное связывание начального участка ORF IRES ВГС в мРНК-связывающем канале достигается, когда старт-кодон распознается инициаторной тРНК. В этом отношении IRES-зависимая инициация трансляции имеет сходство с механизмами инициации трансляции у эубактерий и канонической инициации трансляции у эукариот.

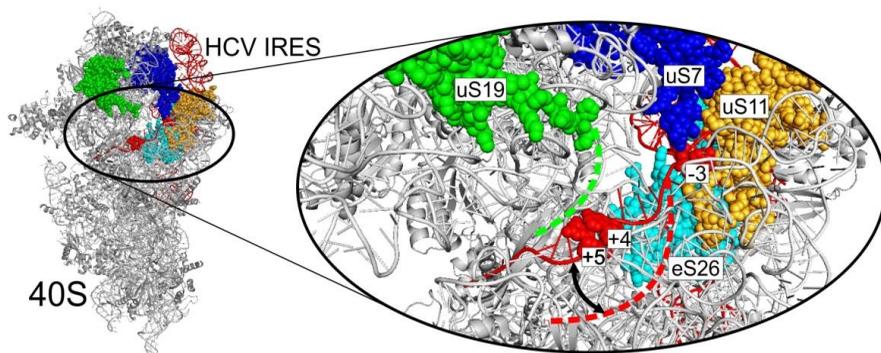


Рис. 10. Предполагаемое расположение кодирующей последовательности IRES ВГС в бинарном комплексе IRES с 40S субчастицей рибосомы. Возможное положение С-концевого фрагмента uS19, который не представлен в структуре, показано зеленой пунктирной линией. Предполагаемое расположение ORF IRES ВГС, когда она не контактирует с uS19, показано красной пунктирной линией. Двойная стрелка подчеркивает гибкость участка IRES ВГС после стартового кодона, из-за которой он не может быть зафиксирован в мРНК-связывающем канале 40S субчастицы.

#### 4 Роль рибосомных белков человека в регуляции собственного биосинтеза на уровне сплайсинга кодирующих их пре-мРНК

#### 4.1 Способность рибосомных белков uS15 и uS9 связываться с их кодирующими пре-мРНК и ингибировать их сплайсинг

Для исследования функционального значения интрона 1 пре-мРНК белка uS15 человека клетки НЕК 293 транзигентно трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими миниген рибосомного белка uS15, сцепленный с геном, кодирующим репортерный флуоресцентный белок ECFP (Рис. 11). Первая конструкция (pECFP-S13) содержала кодирующую часть кДНК рибосомного белка uS15, вставленную в вектор pECFP-N1 в одной транслируемой рамке с геном белка ECFP. Вторая конструкция (pECFP-S13-int1) была похожа на pECFP-S13, но дополнительно содержала первый интрон гена рибосомного белка uS15, вставленный в кодирующую часть его кДНК между последовательностями, соответствующими экзонам 1 и 2. Относительное клеточное содержание мРНК, кодирующей белок uS15 (включая его эндогенную и химерную формы), было определено с помощью ПЦР в реальном времени (Рис. 11).

Примечательно, что уровень мРНК рибосомного белка uS15 в клетках, трансфицированных плазмидой pECFP-S13-int1, содержащей первый интрон гена этого белка, был практически в четыре раза меньше, чем в клетках, трансфицированных конструкцией pECFP-S13, не содержащей этого интрона. Эти результаты позволили предположить, что между уровнем рибосомного белка uS15 в клетке и скоростью экспрессии его гена может существовать обратная связь, регулирующая уровень экспрессии данного гена на стадии сплайсинга его пре-мРНК, и что первый интрон этой пре-мРНК мог бы быть вовлечён в механизм регуляции сплайсинга по принципу обратной связи.

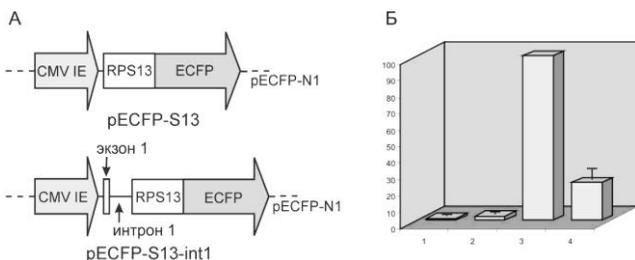


Рис. 11. Повышенная экспрессия гена рибосомного белка uS15 подавляет экспрессию минигена этого белка, содержащего интрон 1. (А) Диаграммы векторов pECFP-S13 и pECFP-S13-int1. (Б)

Относительные количества мРНК, кодирующих рибосомный белок uS15 (как эндогенный, так и экзогенный) в клетках НЕК 293: нетрансфицированных (столбец 1), трансфицированных исходной плазмидой pECFP-N1 (столбец 2), плазмидой pECFP-S13 (столбец 3, принят как 100 у. е.) и плазмидой pECFP-S13-int1 (столбец 4). Величина ошибки приведена по трём биологическим повторам. Для стандартизации количества РНК использованы праймеры, специфичные для кДНК GAPDH.

Чтобы проверить, может ли рибосомный белок uS15 человека связываться непосредственно с первым интроном кодирующей его пре-мРНК, и чтобы изучить влияние этого белка на сплайсинг своей пре-мРНК *in vitro*, с помощью

ПЦР был амплифицирован и вставлен под контроль T7 промотора участок гена белка uS15, содержащий интрон 1, и участки фланкирующих его экзонов. На основе полученной ДНК-конструкции был синтезирован соответствующий РНК-транскрипт (S13INT), чья специфичность связывания с рибосомным белком uS15 была продемонстрирована в ряде экспериментов. Таким образом, было показано, что белок uS15 способен селективно связываться с фрагментом кодирующей его пре-мРНК, содержащим первый интрон. Аналогичные опыты, выполненные с рибосомным белком uS9, также выявили довольно высокое сродство этого белка ( $Ka = (1.1 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) к РНК-транскрипту, содержащему первый интрон кодирующей его пре-мРНК, фланкированный фрагментами соседних экзонов (S9INT). Таким образом, можно заключить, что именно специфическое связывание рибосомного белка uS15 с первым интроном своей пре-мРНК приводило к снижению эффективности сплайсинга в опытах *in vivo*.

Для установления эффектов, оказываемых рибосомными белками uS15 и uS9 на сплайсинг собственных пре-РНК, были использованы РНК-транскрипты, соответствующие фрагментам этих пре-мРНК, несущим первый интрон, фланкированный экзонами, которые применяли в опытах по изучению связывания этих рибосомных белков с их пре-мРНК (Рис. 12).

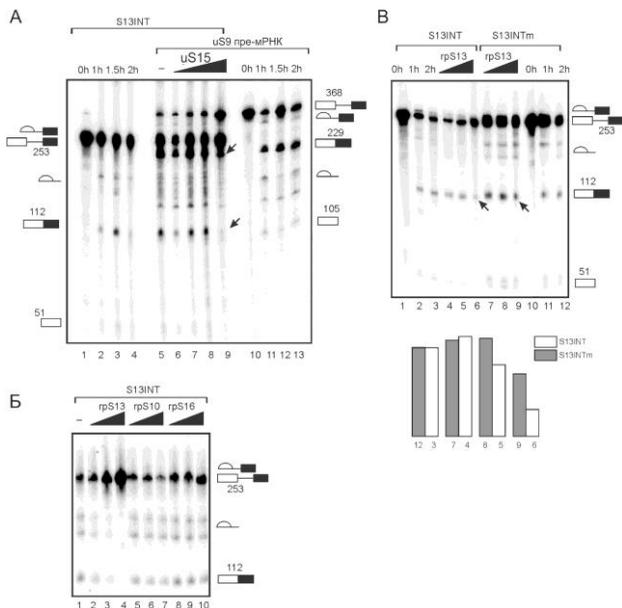


Рис. 12. Рибосомный белок uS15 специфично ингибирует сплайсинг *in vitro* фрагмента S13INT. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов сплайсинга электрофорезом в денатурирующем 6%-ном ПААГ. (А) Кинетика сплайсинга РНК-транскриптов S13INT и S9INT в условиях сплайсинга *in vitro* (дорожки 1 – 4 и 10 – 13 соответственно) и смеси этих транскриптов через 2 ч инкубации в присутствии белка uS15, взятого в концентрации 0.3 мкМ (дорожка 6), 1 мкМ (7), 3 мкМ (8) и 8 мкМ (9), или в его

отсутствие (дорожка 5). Положение фрагментов РНК в геле и их длина отмечены слева (для S13INT) и справа (для S9INT). Стрелками (дорожка 9) отмечены: вверх – полоса мРНК-продукта, образующегося при сплайсинге фрагмента S9INT, вниз – отсутствие

полосы мРНК-продукта, образующегося при сплайсинге фрагмента S13INT. (Б) Эффект рибосомных белков uS15 (gpS13), eS10 (gpS10) и uS9 (gpS16) на сплайсинг фрагмента S13INT. Продукты сплайсинга S13INT после инкубации в течение 2 ч в присутствии белков uS15 (дорожки 2 – 4), eS10 (5 – 7) и uS9 (8 – 10), взятых в концентрации 1 мкМ (2, 5, 8), 5 мкМ (3, 6, 9) и 8 мкМ (4, 7, 10), либо в отсутствие белков (дорожка 1). (В) Сравнение эффектов белка uS15 на сплайсинг фрагментов S13INT и S13INTm. Дорожки 1 – 3 и 10 – 12 – кинетика реакции сплайсинга. Дорожки 4 – 6 и 7 – 9 показывают образование продуктов сплайсинга фрагментов S13INT и S13INTm соответственно после 2 ч инкубации в присутствии белка uS15, взятого в концентрации 1 мкМ (дорожки 4 и 7), 3 мкМ (5 и 8) и 6 мкМ (6 и 9). Стрелками указаны мРНК-продукты соответствующих фрагментов. Столбцы на диаграмме представляют отношение интенсивностей полос мРНК-продукта и исходной пре-мРНК в соответствующих дорожках геля вверху в условных единицах.

Добавление рекомбинантных рибосомных белков uS15 или uS9 человека в реакционные смеси на основе ядерного экстракта клеток HeLa для сплайсинга *in vitro* соответствующих фрагментов пре-мРНК вызывало понижение эффективности их сплайсинга. “Чужеродные” рекомбинантные рибосомные белки человека, eS10 и uS9, добавленные в реакционную смесь в тех же концентрациях, что и белок uS15, не влияли на сплайсинг фрагмента его пре-мРНК. Кроме того, эффективность ингибирования сплайсинга транскрипта S13INTm, содержащего тринуклеотидные замены в районах 5'- и 3'-сайтов сплайсинга, белком uS15 была существенно ниже, чем транскрипта S13INT. Аналогичную картину наблюдали также для рибосомного белка uS9, который ингибировал сплайсинг *in vitro* фрагмента его пре-мРНК, содержащего первый интрон.

Таким образом, рибосомные белки uS15 и uS9 человека способны специфично связываться с кодирующими их пре-мРНК в районе первого интрона и ингибировать их сплайсинг *in vitro*. Иными словами, между уровнем каждого из этих белков и эффективностью вырезания первого интрона из соответствующих им пре-мРНК существует отрицательная обратная связь.

#### **4.2 Определение участков связывания рибосомных белков uS15, uS9 и eS26 на фрагментах соответствующих им пре-мРНК, и механизм контроля экспрессии генов этих белков на уровне сплайсинга**

Для определения участков связывания рибосомных белков uS15 и uS9 на соответствующих им пре-мРНК был использован метод футпринтинга с использованием РНКазы T1, T2 и V1. В результате связывания с белком uS15 в транскрипте S13INT оказываются защищёнными от гидролиза фосфодиэфирные связи вблизи 5'- и 3'-сайтов сплайсинга первого интрона, а также рядом с предполагаемой точкой ветвления первого интрона. Полученные результаты однозначно свидетельствовали о том, что ингибирование сплайсинга фрагмента пре-мРНК рибосомного белка uS15, наблюдаемое при избыточном уровне этого белка, обусловлено его связыванием с участками пре-мРНК, расположенными вблизи консенсусных последовательностей сплайсинга в её

первом интроне. Похожим способом был определён участок связывания рибосомного белка uS9 на фрагменте S9INT. По данным ферментативного футпринтинга белок uS9 защищал от гидролиза РНКазами T1 и T2 три фосфодиэфирные связи вблизи точки ветвления первого интрона, и две фосфодиэфирные связи вблизи 3'-сайта сплайсинга.

Ранее было показано, что рибосомный белок eS26 человека также способен ингибировать сплайсинг *in vitro* кодирующей его пре-мРНК (Ivanov *et al.*, 2005). Чтобы получить информацию о нуклеотидах пре-мРНК белка eS26, формирующих участок связывания этого белка, было выполнено зондирование структуры фрагмента этой пре-мРНК, содержащего первый интрон и фланкирующие его экзоны (S26INT) в комплексе с eS26 с помощью гидроксил-радикалов. В присутствии eS26 доступность гидроксил-радикалам у части нуклеотидов этой РНК была заметно (на 30-50%) снижена. Наибольшее число таких нуклеотидов сконцентрировано в районе, который непосредственно перекрывается с 3'-сайтом сплайсинга первого интрона. Второй район включает нуклеотиды, расположенные во втором экзоне на некотором удалении от 3'-сайта сплайсинга. Можно заключить, что участок связывания eS26 на фрагменте S26INT формируют, в основном, нуклеотиды, расположенные в районе 3'-сайта сплайсинга первого интрона.

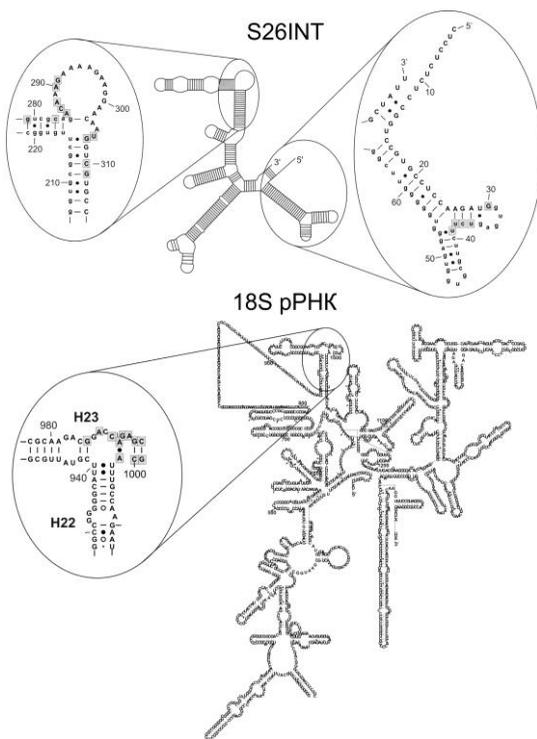


Рис. 13. Схематическое представление вторичной структуры 18S рРНК человека и рассчитанной вторичной структуры фрагмента S26INT. На структуре S26INT выделены районы 3'- (слева) и 5'- (справа) сайтов сплайсинга первого интрона, содержащие нуклеотиды (отмечены серыми квадратами), чья доступность атаке гидроксил-радикалами уменьшалась при связывании S26INT с рибосомным белком eS26. На структуре 18S рРНК выделен район, с которым связывается белок eS26 в 40S субчастице рибосомы, где отмечены (серыми квадратами) нуклеотиды, контактирующие с этим белком.

Сопоставляя структуры участков связывания рибосомного белка eS26 на фрагменте S26INT и на 18S рРНК (Рис. 13), можно выделить одинаковый структурный элемент, присутствующий в обеих РНК в области их контакта с белком, а именно: протяжённую пурин-богатую петлю в районе сочленения двух спиралей. В S26INT такая 22-звенная петля располагается в районе нуклеотидов 285-306, а в 18S рРНК 18-звенная петля в районе 986-1003 находится между спиральями h22 и h23. Можно видеть, что нуклеотиды фрагмента S26INT, защищаемые eS26 от действия гидроксил-радикалов, и нуклеотиды 18S рРНК, контактирующие с eS26 в рибосоме, расположены, преимущественно, в 5'-концевых участках соответствующих петель (Рис. 13). Следовательно, структурный элемент РНК, содержащий пурин-богатую петлю в районе сочленения двух спиралей, мог бы быть тем характерным мотивом, который узнаёт eS26 при связывании с кодирующей его пре-мРНК при регуляции её сплайсинга и с 18S рРНК в процессе сборки малой субчастицы рибосомы.

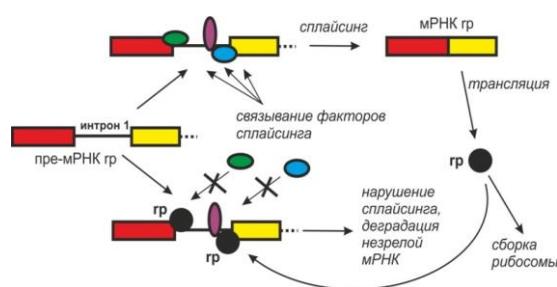


Рис. 14. Механизм авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков на уровне сплайсинга. Рибосомные белки (rp) контролируют экспрессию своих генов по принципу обратной связи: будучи в концентрации избыточной для сборки рибосомных субчастиц, рибосомные белки связываются

с консенсусными последовательностями сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК. Это связывание нарушает взаимодействие факторов сплайсинга с данными последовательностями, что приводит в итоге к ингибированию формирования мРНК.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что рибосомный белок eS26 человека узнаёт свои участки связывания на разных видах РНК по принципу структурной мимикрии. В целом, результаты по определению участков связывания рибосомных белков uS15, uS9 и eS26 на фрагментах, соответствующих им пре-мРНК выявили интересную закономерность: оказалось, что эти участки находятся вблизи функциональных консенсусных последовательностей сплайсинга в первых интронах этих пре-мРНК. Учитывая, что связывание указанных белков с фрагментами соответствующих им пре-мРНК приводит к ингибированию сплайсинга этих фрагментов в ядерном экстракте клеток, можно утверждать, что это связывание нарушает взаимодействие компонентов аппарата сплайсинга с вышеуказанными консенсусными последовательностями. Полученные данные свидетельствуют в пользу существования в клетках высших эукариот специального механизма регуляции экспрессии генов рибосомных белков на уровне сплайсинга,

реализующегося по принципу обратной связи. Согласно этому механизму (Рис. 14), при избыточном количестве рибосомный белок способен связываться с кодирующей его пре-мРНК в районе консенсусных последовательностей сплайсинга первого интрона, ингибируя образование зрелой мРНК и, тем самым, приостанавливая собственный биосинтез.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа представляет собой, по сути, первое систематическое исследование структурно-функциональных свойств индивидуальных рибосомных белков человека. Применение в данном исследовании набора современных подходов к изучению белков и РНК-белковых комплексов, включающих молекулярно-биологические, химические и физические методы исследований, дало возможность не только выявить характерные свойства рибосомных белков человека, но и определить ранее не известные черты их взаимодействий с различными видами РНК. Полученные данные позволили существенно расширить имевшиеся на момент начала данной работы знания о функциональном предназначении рибосомных белков и установить особенности некоторых клеточных процессов, таких как сборка рибосомных субчастиц, инициация трансляции гРНК ВГС и регуляция экспрессии генов рибосомных белков, в которых эти белки играют определяющую роль. Достижения этой многолетней работы, которые внесли значительный вклад в развитие современных представлений о свойствах рибосомных белков высших эукариот и их функционировании в вышеупомянутых процессах, рассмотрены ниже.

Следует особо отметить, что выполнение данной работы было бы невозможно без получения в необходимых количествах функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека, поскольку на момент начала настоящего исследования не существовало универсального подхода для приготовления таких белков. Поэтому именно решение задачи по созданию соответствующей платформы на начальном этапе работы обеспечило успех последующих исследований. С использованием разработанной платформы был получен большой набор рекомбинантных рибосомных белков человека, включающий белки uS2, uS3, uS7, uS9, eS10, uS13, uS15, eS19, eS26, eS28 и uL2 а также мутантные формы некоторых из этих белков. Отдельные методические находки, использованные для преодоления трудностей, возникших при получении этих белков в очищенном виде и обусловленных особенностями их структуры, могут быть применены для получения и очистки других РНК-связывающих белков млекопитающих.

Хотя структура эубактериальной рибосомы с атомарным уровнем разрешения на момент начала настоящей работы была установлена с помощью РСА (напр., Van *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001), вопрос о структуре рибосом эукариот вообще и млекопитающих в частности всё ещё был далёк от решения. Выявленные в ходе исследования существенные отличия в порядках диссоциации белков под действием моновалентных катионов из малых

субчастиц рибосом человека и эубактерий и соответственно в наборах сердцевинных белков этих субчастиц дали основания предполагать наличие у рибосомных белков млекопитающих характерных особенностей, влияющих на их связывание с рРНК.

Дальнейшие исследования показали, что универсальные рибосомные белки uS7, uS9 и uS13 человека способны к самостоятельному связыванию с 3'-концевым доменом 18S рРНК, содержащим их участки связывания, в отличие от их эубактериальных гомологов, связывание которых с 16S рРНК требует её предварительного комплексообразования с другими рибосомными белками. При этом участки связывания белков uS7, uS13 и uS9 с 3'-доменом 18S рРНК и белка uS15 с её центральным доменом, в целом, эволюционно консервативны и соответствуют участкам связывания гомологичных рибосомных белков на 16S рРНК. Оказалось, что связывание белков uS7 и uS9 с 18S рРНК происходит кооперативно, а белок uS13 при связывании с 18S рРНК действует как молекулярная скрепка, фиксируя структуру рРНК в районе участка связывания белка в конформации, похожей на конформацию этого района в 40S субчастице. Примечательно, что районы белков uS7, uS15 и uS9, не имеющие гомологии в рибосомных белках эубактерий, не вовлечены в связывание с 18S рРНК, тогда как район белка uS13, отсутствующий у его эубактериального гомолога, формирует контакты со шпилькой h41 18S рРНК. Критическая роль эукариот-специфичного района рибосомного белка в связывании с рРНК была установлена для белка uS2. Было найдено, что уровень данного белка в 40S субчастицах варьирует, что позволяло использовать 40S субчастицы с низким содержанием природной формы белка uS2 и рекомбинантный аналог uS2, который был способен насыщать их до эквимоларного содержания белка, для изучения особенностей связывания этого белка с 40S субчастицей. Оказалось, что связывание белка uS2 с 40S субчастицами происходит через взаимодействие района 236-262 в специфичном для позвоночных С-концевом фрагменте (CTD) этого белка со спиралью h40 18S рРНК. Консервативная глобулярная часть белка uS2 при этом связывается с рибосомными белками, как можно теперь судить из крио-ЭМ моделей рибосом человека (Anger *et al.*, 2013). В целом, полученные результаты показали, что, несмотря на значительные видимые сходства в связывании гомологичных рибосомных белков эубактерий и человека с соответствующими участками рРНК малой субчастицы, эукариот-специфичные фрагменты рибосомных белков вносят значительные коррективы в это связывание. К настоящему времени участие эукариот/архей специфичных фрагментов рибосомных белков человека в связывании с рРНК и формировании структуры рибосомных субчастиц доказано с помощью крио-ЭМ. Тем не менее, положение CTD белка uS2 на 40S субчастице до сих пор не удалось установить с использованием этого метода.

Проблема полной сборки *in vitro* рибосомных субчастиц млекопитающих, как и эукариот вообще, на сегодняшний день не решена. В настоящей работе была предпринята попытка сборки отдельного морфологического фрагмента 40S субчастицы рибосомы человека – головы. Вначале было установлено, что

голова 40S субчастицы, включающая большой 3'-концевой домен 18S рРНК, может быть отщеплена от остальной её части с помощью гидролиза 18S рРНК РНКазой H по участкам, соединяющим этот домен с двумя другими доменами. Это указывало на принципиальную возможность сборки соответствующего рибонуклеопротеида из отдельных компонентов головы. Определение белкового состава головы выявило в ней эукариот/архей-специфичный белок eS28, расположение которого в 40S субчастице на тот момент было неизвестно. С использованием РНК-транскрипта, моделирующего большой 3'-концевой домен 18S рРНК, и суммарного белка 40S субчастицы был реконструирован рибонуклеопротеид, в котором присутствовал практически весь набор рибосомных белков, характерных для головы 40S субчастицы. Однако, несмотря на то, что по своему белковому составу собранный рибонуклеопротеид хорошо коррелировал с головой 40S субчастицы, некоторые участки 18S рРНК, экспонированные в 40S субчастице, оказались защищёнными в этом рибонуклеопротеиде, что указывало на его неполное соответствие голове 40S субчастицы. По-видимому, из-за высокой степени агрегации РНК-белковых комплексов, обусловленной, скорее всего, неструктурированными эукариот/архей-специфичными участками белков, проблема сборки полных субчастиц рибосом эукариот *in vitro* в принципе не может быть решена вариацией температуры, ионной силы среды и концентрации денатуранта, как в случае эубактерий. В частности, в одной из недавних работ, выполненной на рибосомном белке uS3 дрожжей, показано, что для правильного связывания этого белка на пре-40S субчастице необходимо участие вспомогательных белков – фактора сборки и протеинкиназы, гомологичной казеин киназе 1δ/ε у млекопитающих. Фактор сборки препятствует преждевременной ассоциации N-домена белка uS3 с пре-40S субчастицей до её связывания с C-доменом этого белка, а протеинкиназа обеспечивает последующее корректное позиционирование N-домена белка uS3 на 18S пре-рРНК путём фосфорилирования фактора сборки и его последующей диссоциации (Mitterer *et al.*, 2016). Кроме того, в более ранней работе (Schafer *et al.*, 2006) показано, что для формирования зрелой 40S субчастицы рибосомы дрожжей требуется также фосфорилирование самого белка uS3 вышеупомянутой протеинкиназой. Очевидно, в связывании с пре-рРНК других рибосомных белков могут также участвовать подобные вспомогательные белки, что делает проблему реконструкции *in vitro* активных субчастиц рибосом эукариот трудной или даже вообще неразрешимой задачей.

Посттрансляционная модификация – гидроксилирование у рибосомных белков uL2, uL15 и uS12 человека была открыта сравнительно недавно (Ge *et al.*, 2012), однако её роль оставалась неизвестной. Примечательно, что в условиях гипоксии гидроксилирования этих белков не происходит, но, тем не менее, они встраиваются в рибосомы, указывая на то, что данная модификация не влияет на сборку рибосомных субчастиц. В настоящей работе удалось показать, что связывание гидроксилированного рибосомного белка uL2 с фрагментом 28S рРНК, содержащим спираль H93, контактирующую с этим

белком вблизи рибосомного каталитического центра в 60S субчастице, вызывает сильные изменения структуры РНК в районах, прилегающих к универсально консервативным нуклеотидам, формирующим этот центр. Таким образом, гидроксильная группа на остатке His216 в рибосомном белке uL2 млекопитающих способствует стабилизации конформации белка, благоприятной для его связывания со спиралью H93 28S рРНК при сборке 60S субчастицы рибосомы. По-видимому, это связывание вызывает такие структурные перестройки, которые необходимы для поддержания правильной архитектуры каталитического центра в зрелой рибосоме.

К началу настоящей работы в нескольких лабораториях уже велись исследования механизма IRES-зависимой инициации трансляции гРНК ВГС. В частности, было получено некоторое представление о структуре бинарного комплекса IRES ВГС с 40S субчастицей рибосомы (напр., Spahn *et al.*, 2011) и были определены отдельные белки, контактирующие с IRES в этом комплексе (напр., Otto *et al.*, 2002). Однако конкретная роль структурных элементов 40S субчастицы в образовании бинарного комплекса оставалась неясной, без чего было невозможно прийти к пониманию молекулярного механизма процесса, посредством которого РНК ВГС подчиняет белоксинтезирующий аппарат человека для синтеза собственного полипротеина. Результаты настоящей работы позволили пролить свет на структурные основы IRES-зависимой инициации трансляции. Так, с помощью флуоресцентного мечения экспонированных на поверхности рибосомы остатков лизина было показано, что в белках eS1, eS10 и eS27, не имеющих эубактериальных гомологов, эти остатки прямо вовлечены в связывание 40S субчастицы с IRES ВГС. Обнаружено, что практически все экспонированные остатки лизина белка eS27 участвуют в связывании района IRES, образованного сочленением субдоменов Ша, Шб и Шс с центральным стеблем домена Ш. Часть остатков лизина в белке eS10 оказывается вовлечённой в связывание района, соответствующего начальному участку открытой рамки считывания гРНК ВГС, а часть остатков лизина белка eS1 принимает участие в связывании доменов II и III IRES ВГС. Таким образом, рибосомным белкам eS1 и eS27 принадлежит определяющая роль в связывании IRES ВГС с 40S субчастицей рибосомы на начальной стадии инициации трансляции его гРНК. В это связывание вовлекается также специфичный для позвоночных CTD домен рибосомного белка uS2. Белки uS11 и eS26 в бинарном комплексе IRES ВГС с 40S субчастицей тесно сближены с нуклеотидом в положении -3 IRES, тогда как белок uS19 – компонент рибосомного декодирующего центра соседствует с нуклеотидами, фланкирующими старт-кодон AUG с 3'-стороны лишь в незначительной доле таких комплексов. Последнее указывает на то, что в подавляющем большинстве бинарных комплексов IRES ВГС с 40S субчастицей кодирующая часть IRES не фиксирована стабильно в мРНК-связывающем канале, как предполагалось в одной из ранних работ (Pestova *et al.*, 1998) на основании данных тоупринтинга IRES ВГС в аналогичном комплексе. Другим принципиальным моментом в связывании IRES ВГС с 40S субчастицей,

впервые установленным в настоящей работе, является непосредственное взаимодействие IRES с 18S рРНК и последующие структурные перестройки в ней, обусловленные этим связыванием. При связывании домена III IRES ВГС с рибосомными белками 40S субчастицы апикальная часть субдомена IIIд оказывается вовлечённой в комплементарные взаимодействия с нуклеотидами сегмента экспансии ES7 спирали h26 18S рРНК. Это связывание стабилизирует весь комплекс IRES ВГС с 40S субчастицей и, по-видимому, способствует взаимодействию домена II и нуклеотидов с 5'-стороны от инициаторного кодона с белком uS7 в мРНК-связывающем канале, что индуцирует конформационный переход 18S рРНК в области нуклеотида G1639. Таким образом, происходит активация 40S субчастицы, делающая её способной к селекции инициаторной тРНК с последующим образованием 48S предынициаторного комплекса. Многие из полученных в настоящей работе данных по изучению бинарного комплекса IRES ВГС с 40S субчастицей уже нашли подтверждение при исследовании его структуры методом крио-ЭМ, а также в исследованиях, выполненных с использованием сайт-направленного мутагенеза. В частности, с помощью этих методов подтверждены интенсивные контакты субдомена IIIа/с IRES ВГС с белком eS27, а также комплементарные взаимодействия между триплетами GGG в субдоме IIIд IRES ВГС и CCC в петле спирали h26 18S рРНК (Quade *et al.*, 2015; Matsuda and Mauro, 2014).

Результаты настоящей работы по изучению авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на стадии сплайсинга являются пионерскими даже на сегодняшний день. Ранее подобные данные были известны только для двух генов рибосомных белков низших эукариот – дрожжей (Dabeva *et al.*, 1986; Fewell and Woolford, 1999) и одного гена рибосомного белка нематоды (Mitrovich and Anderson, 2000). Что касается генов рибосомных белков млекопитающих, то имелись лишь единичные работы, где были получены указания, что подобный тип регуляции мог бы осуществляться и у некоторых из этих генов, в частности у гена рибосомного белка eS26 человека (Ivanov *et al.*, 2005). Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе для белка uS15 в опытах *in vivo*, явились первым прямым доказательством существования клеточного механизма, посредством которого продукты генов рибосомных белков человека могут вовлекаться в регуляцию их экспрессии на уровне сплайсинга. В основе этого механизма лежит принцип обратной связи: рибосомные белки, будучи в избыточной концентрации, связываются с консенсусными последовательностями сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК, и тем самым ингибируют формирование зрелых мРНК. Выявленные в настоящей работе общие черты в организации участков связывания рибосомного белка eS26 человека на пре-мРНК и 18S рРНК, наряду с аналогичными данными, известными для двух рибосомных белков дрожжей, позволили сделать вывод об узнавании рибосомными белками разных видов РНК по принципу структурной мимикрии. Этот принцип, по-видимому, исключительно важен для реализации рибосомными белками так называемых

внерибосомных функций, проявляемых в различных клеточных процессах, поскольку позволяет им узнавать универсальные структурные элементы на различных РНК. Действительно, в настоящее время появляется всё больше информации о контактах рибосомных белков млекопитающих с различными видами клеточных РНК, что делает функциональные проявления отдельных рибосомных белков иногда самыми неожиданными. В частности, недавно показано, что рибосомный белок uS1 человека принимает непосредственное участие в процессинге предшественника U11 мРНК и сплайсинге минорного типа (Gorapenko *et al.*, 2017), и что структура участка связывания uS1 на U11 пре-мРНК напоминает структуру его участка связывания на 18S рРНК.

Подводя итог, можно заключить, что совокупность полученных в настоящей работе результатов даёт новое представление о функциональных свойствах рибосомных белков человека, открывая свежие горизонты в изучении конкретных ролей рибосомных белков в биогенезе и функционировании важнейших клеточных структур. Фундаментальные основы знаний о функциональных свойствах рибосомных белков человека и способах их исследования, заложенные в данной работе, в будущем, несомненно, позволят получить исчерпывающую информацию о сложнейшей сети внутриклеточных связей, вовлекающих эти белки, и об их отдельных “партиях”, которые они исполняют в слаженном “клеточном оркестре”. Обладая такой информацией, в дальнейшем можно приступить к разработке подходов, направленных на борьбу с заболеваниями, в основе которых лежат дефекты экспрессии генов рибосомных белков, сборки рибосомных субчастиц или трансляция чужеродных для клетки мРНК.

## **ВЫВОДЫ**

1. Разработана универсальная платформа для получения рекомбинантных рибосомных белков человека, и с её использованием получен репрезентативный набор таких белков и их мутантных форм, пригодных для структурно-функциональных исследований.

2. Установлены существенные различия в порядках диссоциации белков из малых субчастиц рибосом человека и эубактерий под действием моновалентных катионов. Рибосомы млекопитающих гораздо более чувствительны к высокой концентрации моновалентных катионов, чем эубактериальные рибосомы, что указывает на наличие у рибосомных белков млекопитающих характерных особенностей, определяющих их взаимодействие с рРНК.

3. Выявлены характерные черты РНК-белковых взаимодействий в различных районах 40S субчастицы с использованием рекомбинантных рибосомных белков и фрагментов 18S рРНК, содержащих участки связывания этих белков. Показано, что рибосомные белки могут стабилизировать структуру рРНК, действуя подобно ионам  $Mg^{2+}$  или как “молекулярная скрепка”, что должно способствовать их кооперативному связыванию с рРНК. Установлено, что участки связывания универсальных рибосомных белков на

18S рРНК, в целом, эволюционно консервативны. Фрагменты белков, не имеющие гомологии в соответствующих белках эубактерий, либо образуют дополнительные контакты с 18S рРНК, участвуя тем самым в формировании структуры рибосомы, либо остаются свободными, что позволяет им участвовать во взаимодействии с лигандами рибосомы – участниками трансляции.

4. Получены доказательства роли посттрансляционной модификации – гидроксирования рибосомного белка uL2 по остатку His216 в формировании структуры каталитического центра рибосомы человека. Показано, что связывание гидроксированного uL2, в отличие от его немодифицированного аналога, с фрагментом 28S рРНК, участвующим в формировании каталитического центра на 60S субчастице, способствует конформационным перестройкам 28S рРНК, делающим её структуру такой, как в зрелых 60S субчастицах. Следовательно, гидроксирование рибосомного белка uL2 человека может играть ключевую роль в поддержании функционально активной структуры рибосомы.

5. Получены свидетельства независимого характера сборки морфологической части 40S субчастицы рибосомы – головы, включающей большой 3'-концевой домен 18S рРНК. Показано, что голова может быть отщеплена от остальной части 40S субчастицы и что соответствующий голове рибонуклеопротеид может быть реконструирован на основе РНК-транскрипта, соответствующего большому 3'-концевому домену 18S рРНК, и суммарного белка 40S субчастицы. Собранный рибонуклеопротеид по своему белковому составу относительно хорошо коррелирует с головой 40S субчастицы, но не полностью соответствует ей по экспонированности нуклеотидных остатков 18S рРНК, что может быть обусловлено её неспецифическим связыванием с неструктурированными эукариот/архей-специфичными участками белков.

6. Определены структурные элементы 40S субчастицы рибосомы человека, взаимодействующие со специфическим структурным участком (IRES) геномной РНК вируса гепатита С (ВГС), в составе бинарного комплекса с IRES ВГС. Впервые продемонстрировано, что наряду с рибосомными белками во взаимодействие с IRES вовлекаются конкретные нуклеотиды 18S рРНК. Предложен молекулярный механизм, обеспечивающий селекцию инициаторной Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> IRES-связанными 40S субчастицами, в основе которого лежат конформационные перестройки 18S рРНК. Рибосомный белок uS7 может играть центральную роль в промотировании взаимодействий между доменами II и IV IRES ВГС, индуцирующих эти перестройки.

7. Открыт новый способ авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на уровне сплайсинга их пре-мРНК. В основе этого способа лежит способность рибосомных белков связываться с консенсусными участками сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК, и тем самым ингибировать вырезание этого интрона. Показано, что консенсусные участки связывания для разных рибосомных белков могут различаться. Общие черты в структурах участков связывания рибосомных белков человека на пре-

мРНК и рРНК указывают на то, что эти белки узнают свои участки на разных видах РНК по принципу структурной мимикрии.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Малыгин А.А., Шауло Д.Д., Карпова Г.Г. Диссоциация белков из 40S субчастиц рибосом человека в градиенте хлористого лития // Молекуляр. биология. – 2000. – Т.34. – С.754-758.

2. Malygin A.A., Shaulo D.D., Karpova G.G. Proteins S7, S10, S16 and S19 of the human 40S ribosomal subunit are most resistant to dissociation by salt // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V.1350. – P.213-216.

3. Malygin A.A., Baranovskaia O.I., Ivanov A.V., Karpova G.G. Expression and Purification of Human Ribosomal Proteins S3, S5, S10, S19, and S26 // Protein Express. Purif. – 2003. – V.28. – P.57-62.

4. Иванов А.В., Барановская О.И., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. Получение рекомбинантных рибосомных белков S3, S5, S10, S19 и S26 человека в препаративных количествах // Биотехнология. – 2003. – Т.2. – С.30-37.

5. Парахневич Н.М., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. Рекомбинантный рибосомный белок S16 человека: получение, очистка, рефолдинг и стабильность // Биохимия. – 2005. – Т.70. – С.941-946.

6. Malygin A.A., Parakhnevitch N.M. Karpova G.G. Human ribosomal protein S13: cloning, expression, refolding, and structural stability // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – V.1747 – P.93-97.

7. Яньшина Д. Д., Малыгин А. А., Карпова Г. Г. Связывание рибосомного белка S5 человека с фрагментом 1203-1236/1521-1698 18S рРНК // Молекуляр. биология. – 2006. – Т.40. – С.460-467.

8. Парахневич Н.М., Иванов А.В., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. Рибосомный белок S13 человека ингибирует сплайсинг собственной пре-мРНК // Молекуляр. биология. – 2007. – Т.41. – С.51-58.

9. Яньшина Д. Д., Малыгин А.А., Карпова Г. Г. Связывание рибосомного белка S16 человека с фрагментом 1203-1236/1521-1698 18S рРНК // Молекуляр. биология. – 2007. – Т.41 – С.932-938.

10. Malygin A.A., Parakhnevitch N.M., Ivanov A.V., Eperon I.C., Karpova G.G. Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism // Nucleic Acids Res. – 2007. – V.35 – P.6414-6423.

11. Косинова О.А., Малыгин А.А., Бабайлова Е.С., Карпова Г.Г. Специфичный для эукариот С-концевой домен рибосомного белка SA (p40) обеспечивает его связывание с малой субчастицей рибосомы // Молекуляр. биология. – 2008. – Т.42. – С.1023-1029.

12. Malygin A.A., Yanshina D.D., Karpova G.G. Interactions of human ribosomal proteins S16 and S5 with an 18S rRNA fragment containing their binding sites // Biochimie. – 2009. – V.91. P.1180-1186.

13. Яньшина Д.Д., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. Взаимное влияние рибосомных белков S5 и S16 человека на их связывание с фрагментом 1203-1236/1521-1698 18S рРНК // Молекуляр. биология. – 2009. – Т.43. – С.700-708.

14. Малыгин А.А., Бочкаева З.В., Бондаренко Е.И., Косинова О.А., Локтев В.Б., Шатский И.Н., Карпова Г.Г. Связывание IRES-элемента РНК вируса гепатита С 40S субчастицей рибосомы: роль белка р40 // Молекуляр. биология. – 2009. – Т.43. – С.1070-1076.

15. Malygin A.A., Karpova G.G. Structural motifs of the bacterial ribosomal proteins S20, S18 and S16 that contact rRNA present in the eukaryotic ribosomal proteins S25, S26 and S27A, respectively // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V.38. – P.2089-2098.

16. Malygin A.A., Karpova G.G. Site-specific cleavage of the 40S ribosomal subunit reveals eukaryote-specific ribosomal protein S28 in the subunit head // *FEBS Lett.* – 2010. – V.584. – P.4396-4400.

17. Malygin A.A., Babaylova E.S., Loktev V.B., Karpova G.G. A region in the C-terminal domain of ribosomal protein SA required for binding of SA to the human 40S ribosomal subunit // *Biochimie.* – 2011. – V.93. – P.612-617.

18. Ilin A.A., Malygin A.A., Karpova G.G. Ribosomal protein S18e as a putative molecular staple for the 18S rRNA 3'-major domain core // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V.1814. – P.505-512.

19. Иванов А.В., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. Связывание рибосомного белка S13 человека с центральным доменом 18S рРНК // Молекуляр. биология. – 2011. – Т.45. – С.1046-1054.

20. Малыгин А.А., Шатский И.Н., Карпова Г.Г. Белки 40S субчастицы рибосомы человека, участвующие в связывании IRES-элемента вируса гепатита С по данным флуоресцентного мечения // *Биохимия.* – 2013. – Т.78. – С.73-81.

21. Иванов А.В., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. Ионы  $Mg^{2+}$  влияют на структуру центрального домена 18S рРНК вблизи участка связывания рибосомного белка S13 // Молекуляр. биология. – 2013. – Т.47 – С.157-166.

22. Malygin A.A., Kossinova O.A., Shatsky I.N., Karpova G.G. HCV IRES interacts with the 18S rRNA to activate the 40S ribosome for subsequent steps of translation initiation // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V.41. – P.8706-8714.

23. Иванов А.В., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. Общие черты в организации участков связывания рибосомного белка S26e на кодирующей его пре-мРНК и 18S рРНК // Молекуляр. биология. – 2014. – Т.48. – С.491-499.

24. Gopanenko A.V., Malygin A.A., Karpova G.G. Exploring human 40S ribosomal proteins binding to the 18S rRNA fragment containing major 3'-terminal domain // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – V.1854. – P.101-109.

25. Yanshina D.D., Bulygin K.N., Malygin A.A., Karpova G.G. Hydroxylated histidine of human ribosomal protein uL2 is involved in maintaining the local structure of 28S rRNA in the ribosomal peptidyl transferase center // *FEBS Journal.* – 2015. – V.282. – P.1554-1566.

26. Babaylova E.S., Graifer D.M., Malygin A.A., Karpova G.G. Arrangements of nucleotides flanking the start codon in the IRES of the hepatitis C virus in the IRES binary complex with the human 40S ribosomal subunit // *Biochimie.* – 2018. – V.148. – P.72-79.