

ХИМИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 576.31:547.963.32

ДЕЛЕЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МЕЖЦИСТРОННОГО РАЙОНА S12–S7 *str* мРНК *E. coli* ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ ТЕРМОФИЛЬНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА S7

Т. С. Рождественский, Т. И. Рассохин, М. М. Анохина, А. В. Головин, В. А. Спиридонова, А. М. Копылов

(кафедра химии природных соединений)

Статья посвящена изучению связывания термофильного рибосомного белка S7 с набором укороченных фрагментов регуляторного межцистронного района S12–S7 *str* мРНК *E. coli*. Минимальный фрагмент мРНК соответствует шпильке, ограниченной сигнальными триплетами трансляции соседних цистронов. Теоретический анализ всех потенциальных вариантов вторичной структуры выявил возможность существования сложной структуры псевдоузла.

Для интенсивного роста клеток требуется активная работа рибосом, обеспечивающих биосинтез всех белков. Бактериальная рибосома – это надмолекулярный комплекс трех молекул рРНК и пятидесяти различных белков. Синтез компонентов рибосомы и ее сборка (биогеenez) требуют колоссальных клеточных затрат, что определяет необходимость строгой регуляции [1]. Синтез рибосомных белков (р-белков) находится под так называемым аутогенным контролем: один ген в опероне р-белков кодирует белок, который является не только структурным компонентом рибосомы, но и регулятором, контролирующим собственную экспрессию. При росте клеток синтезируемый р-белок-регулятор связывается с рРНК и включается в рибосому. Если уровень его синтеза превышает уровень синтеза рРНК, то этот избыток подавляет синтез большинства (или всех) белков оперона и сбалансированный синтез р-компонентов восстанавливается. Такая схема предполагает способность одного белка специфически взаимодействовать с определенными участками рРНК и мРНК.

Для малой субчастицы рибосом таким ключевым белком-регулятором является S7 [1]. При сборке рибосом S7 связывается с 3'-концевым доменом 16S рРНК и стимулирует связывание остальных белков этого домена [2]. Драгон и Браки-Жингра [3] показали, что участком связывания S7 является небольшой центральный фрагмент этого домена рРНК. Сайто и Номура [4] картировали участок связывания S7 на мРНК *str* оперона р-белков: им оказался межцистронный район S12–S7 мРНК размером около 60 нуклеотидов.

Таким образом, со структурной точки зрения биогеenez рибосомы в бактериальной клетке определяется двумя типами РНК-белковых взаимодействий: S7–16S рРНК и S7–*str* мРНК. Изучение структуры этих комплексов позволит

решить не только сформулированную выше частную задачу, но и приблизиться к пониманию основ специфичности образования РНК-белковых комплексов, т.е. молекулярного «узнавания».

Успех прямого определения структуры нуклеопротеида физико-химическими методами (ЯМР и рентгеноструктурный анализ) зависит от получения комплекса с минимальными размерами. Трехмерная структура термофильного белка S7 недавно определена методом рентгеноструктурного анализа [5, 6]. На ее основе Бримакомб предложил модельный вариант трехмерной организации комплекса S7–фрагмент 16S рРНК [7]. Однако сравнительное экспериментальное изучение двух комплексов для термофильного белка S7 не проводится. Нами было показано, что термофильный S7 может образовывать гетерологичные комплексы *in vitro* с минимальным фрагментом 16S рРНК и с регуляторным межцистронным районом S12–S7 *str* мРНК *E. coli* [8].

Статья посвящена изучению способности термофильного рибосомного белка S7 взаимодействовать с укороченными фрагментами регуляторного межцистронного района S12–S7–*str* мРНК *E. coli*. Минимальный способный связываться с белком фрагмент мРНК соответствует шпильке, ограниченной сигнальными триплетами трансляции соседних цистронов. Теоретический анализ всех потенциальных вариантов вторичной структуры (рис. 1) выявил возможность существования сложной структуры псевдоузла.

Экспериментальная часть

Исходной матрицей для синтеза фрагментов *str* мРНК служила плаزمида pDD146, 5'-концевой вариант pDD157 [8]. Делеционные варианты матрицы для синтеза РНК получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

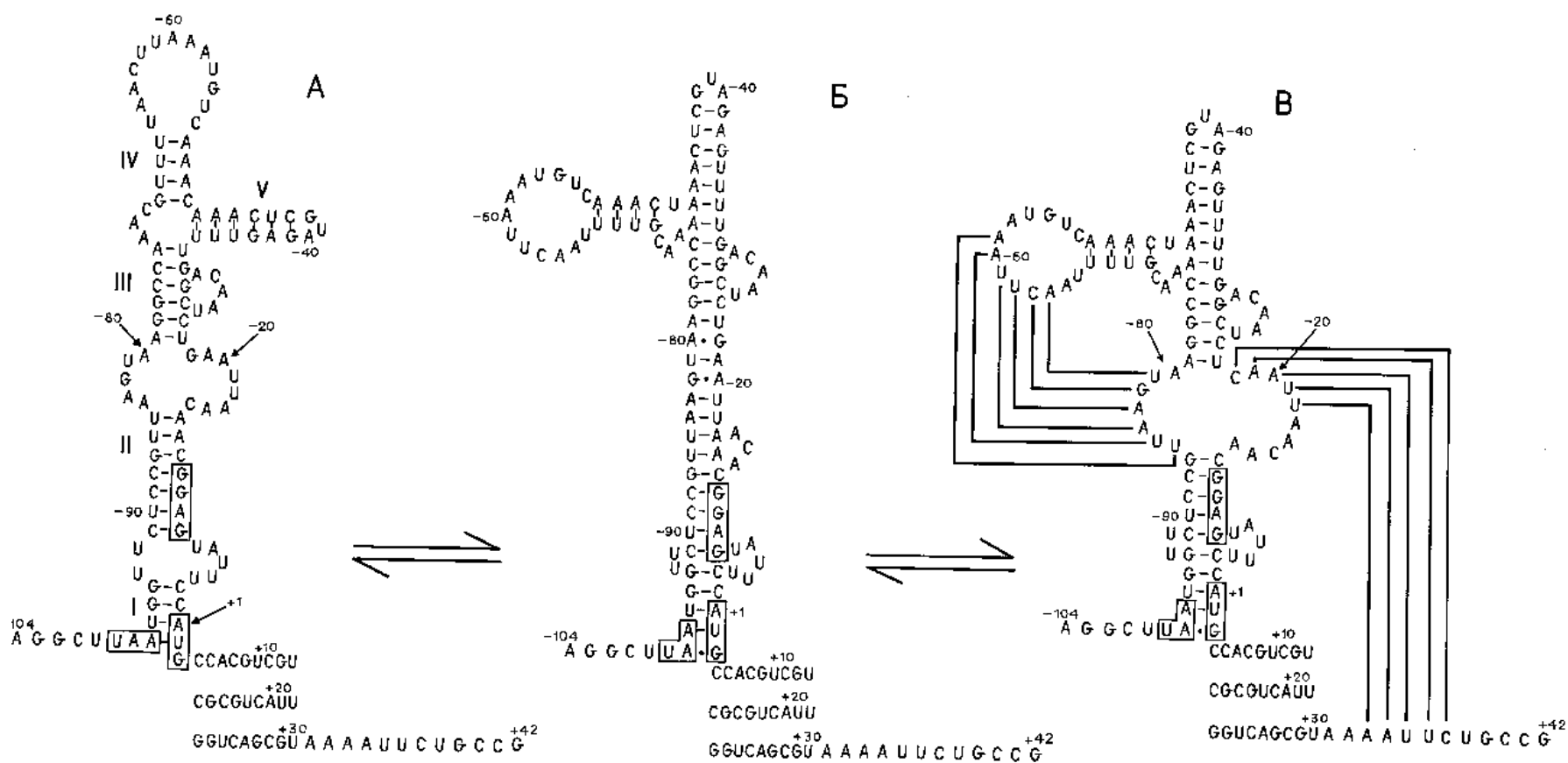


Рис. 1. Предполагаемые модели вторичной структуры межцистронного фрагмента S12-S7 *str* мРНК *E. coli* длиной в 146 н.о. (координата инициаторного кодона AUG цистрона белка S7 принята за +1; выделены сигналы трансляции: UAA – терминирующий кодон цистрона S12, AUG – иницирующий кодон цистрона S7, GGAG – последовательность Шайна-Дальгарно цистрона S7). А. Модель Номуры [4]; Б. Модификация модели Номуры с учетом возможности дополнительной стабилизации, предложенная в данной работе. В. Модель с учетом возможности образования псевдоузлов, предложенная в данной работе

Левый праймер содержал дополнительную некомплементарную последовательность промотора РНК-полимеразы фага Т7, правый праймер ограничивал 3'-концевую последовательность РНК.

Радиоактивную РНК транскрибировали с матричной ДНК в присутствии α -[^{32}P]-УТР (Физико-энергетический институт, Обнинск, Россия) РНК-полимеразой фага Т7 (МБИ, Ферментас, Литва, или любезно предоставленной С. Н. Кочетковым, ИМБ РАН). РНК очищали электрофорезом в полиакриламидном геле, определяли удельную радиоактивность, измеряя поглощение A_{260} и радиоактивность по Черенкову (как правило, она составляла 5000 имп/мин/пмоль). Рибосомный белок S7 был выделен А. В. Каргиновым, как описано ранее [9]. Концентрацию белка определяли электрофорезом по Лэмли и стандартным методом Брэдфорда. Молярную концентрацию рассчитывали из молекулярной массы белка 19.3 кДа.

Комплексообразование проводили в 200 мкл раствора 20 мМ трис-Ас, рН 7.8; 7 мМ MgCl_2 ; 300 мМ NH_4Cl ; 0.2%-й бычий сывороточный альбумин (МБИ, Ферментас, Литва). РНК и белок ренатурировали отдельно, затем инкубировали совместно в течение 30 мин при 42° . Степень комплексообразования измеряли ультрафильтрацией на нитроцеллюлозных фильтрах 0.45 мкм (*Millipore HA* или *Schleicher&Schuel BA85*) при скорости фильтрации 0.5 мл/мин, титруя постоянное количество РНК возрастающим мольным избытком белка. Радиоактивность фильтров определяли гетерогенно в 10 мл воды по Черенкову. Данные рассчитывали с помощью программы *Origin 4.00* (США).

Обсуждение результатов

Работа посвящена определению минимальных размеров фрагмента межцистронной области *str* мРНК *E. coli*,

способного образовывать гетерологичные комплексы с рибосомным белком S7 *T. thermophilus*. Ранее нами было показано [8], что такой комплекс с фрагментом мРНК длиной 146 нуклеотидов образуется с константой диссоциации 100 нМ и может быть основой для дальнейшего структурного анализа. Однако относительно большие размеры комплекса ограничивают применение современных прямых методов для изучения его структуры. Для минимизации размеров фрагмента мРНК был проведен ступенчатый делеционный анализ и определена способность таких укороченных фрагментов РНК связываться с белком S7.

Для исследования рибосомных нуклеопротеидов обычно используют стандартные условия реконструкции рибосом Номуры: 20 мМ Mg^{2+} , 350 мМ KCl [8]. Однако для каждого конкретного комплекса эти условия могут быть специфичными и не обязательно совпадать с условиями интегральной реконструкции рибосомы. Поэтому прежде всего были оптимизированы условия комплексообразования S7-мРНК по ключевым параметрам.

Концентрация ионов магния сильно влияет на структуру и стабильность РНК. При низкой концентрации ионов магния РНК имеет менее стабильную структуру, а при больших концентрациях наблюдается тенденция к агрегации, что приводит к высоким фоновым значениям удержания на фильтре. При оптимизации этого параметра использовали достаточно высокое значение ионной силы (300 мМ), чтобы снизить вклад неспецифических электростатических взаимодействий. В исследованном интервале концентраций ионов магния связывание изменялось не очень сильно; зависимость имела слабо выраженный максимум в районе от 7 до 12 мМ Mg^{2+} (рис. 2). Поэтому для дальнейших опытов было выбрано нижнее значение (7 мМ).

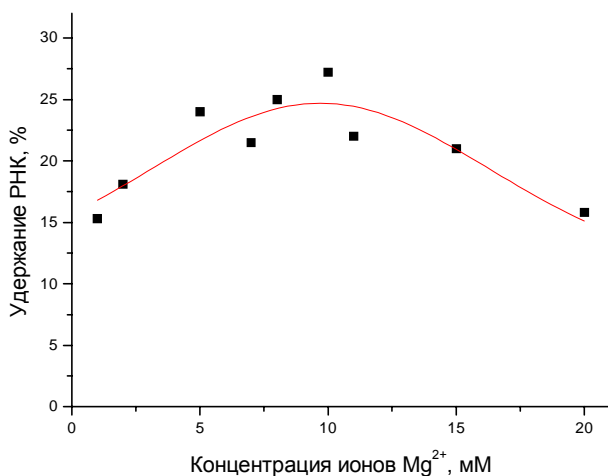


Рис. 2. Влияние концентрации ионов Mg^{2+} на степень удержания мРНК на фильтре в присутствии белка S7 (ионная сила 300 мМ NH_4Cl , соотношение РНК:белок = 1:6)

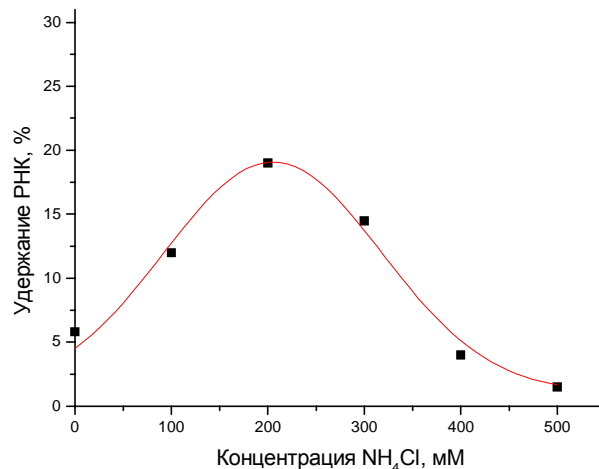


Рис. 3. Влияние ионной силы на степень удержания РНК на фильтре в присутствии белка S7 (концентрация ионов Mg^{2+} 7 мМ, соотношение РНК:белок = 1:6)

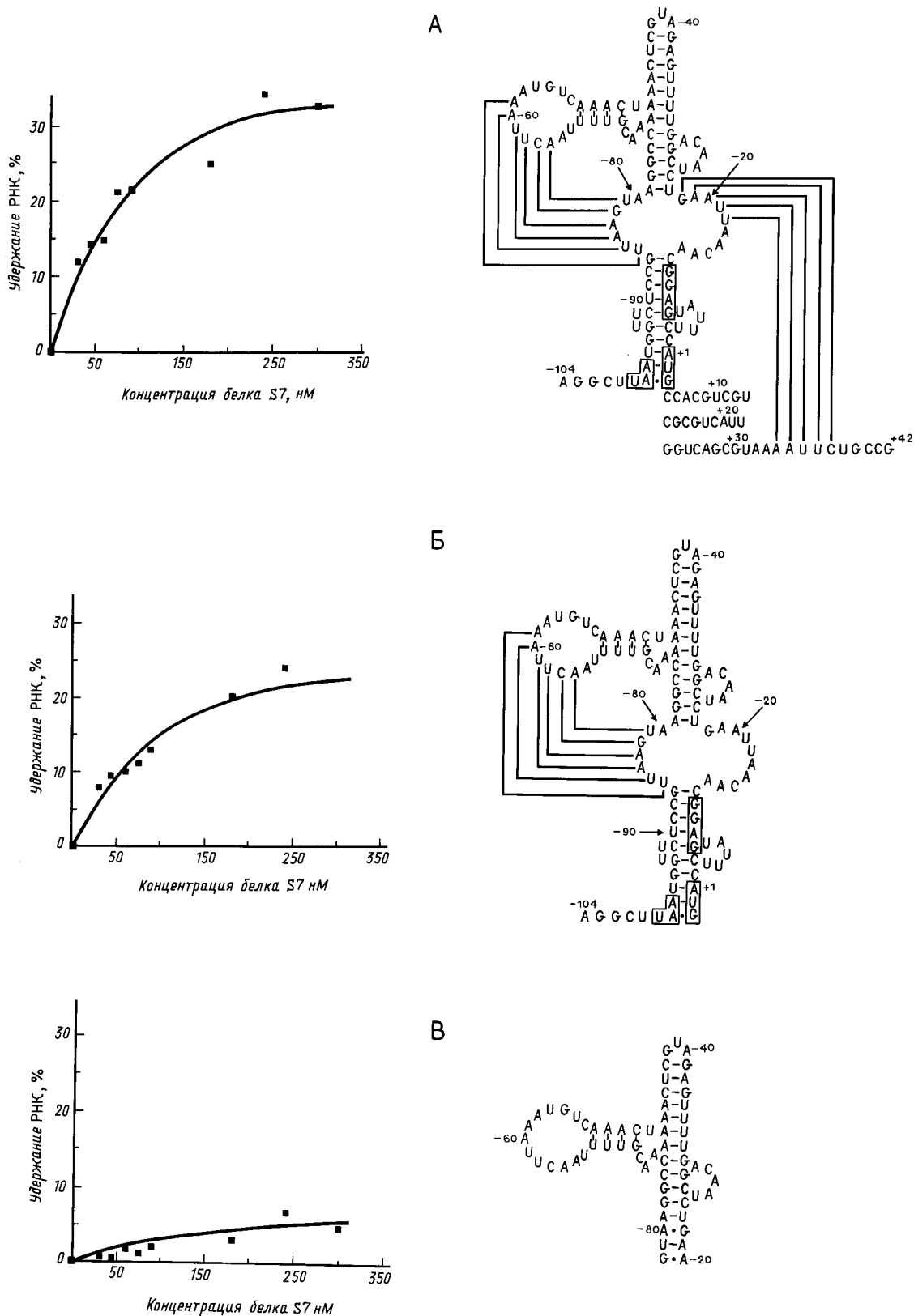


Рис. 4. Изотермы связывания рибосомного белка S7 *T. thermophilus* с набором фрагментов мРНК *E. coli* и предполагаемые модели вторичной структуры РНК: А – связывание белка S7 с фрагментом мРНК длиной 146 н.о. (общая длина мРНК 240 н.о.); концентрация мРНК 3 пмоль; Б – связывание белка S7 с фрагментом мРНК длиной 103 н.о.; концентрация мРНК 7 пмоль; В – связывание белка S7 с фрагментом мРНК длиной 63 н.о.; концентрация мРНК 17 пмоль

Ионная сила раствора также должна иметь оптимум для комплексообразования, поскольку при низких значениях ионной силы высока роль неспецифических электростатических взаимодействий, а при повышении ионной силы происходит диссоциация комплекса. Полученная зависимость имеет хорошо выраженный максимум при ионной силе 200 мМ (рис. 3), однако для дальнейших опытов было выбрано более высокое значение (300 мМ), чтобы максимально избежать неспецифических взаимодействий, при этом эффективность комплексообразования падала всего на четверть.

После оптимизации условий было проведено изучение комплексообразования белка S7 с тремя фрагментами мРНК (рис. 4).

Определение кажущейся константы диссоциации для исходного комплекса проводили, используя транскрипт РНК длиной 240 нуклеотидов (146 смысловых нуклеотидов мРНК), с матрицы ДНК, полученной ПЦР с помощью стандартных прямого и обратного сиквенирующих праймеров

5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

5'-CAGGAAACAGCTATGAC -3'

Синтезируемая с такой матрицы РНК имела размеры большие, чем смысловая часть фрагмента *str* мРНК, поскольку матрица ДНК содержала на 3'-конце фрагмент плазмидной последовательности. Для исходного фрагмента мРНК уровень связывания выходил на плато при 10–14-кратном избытке белка (рис. 4, А). Существенно отметить, что большой избыток белка приводил к аномально резкому возрастанию удерживания на фильтре, что можно интерпретировать как агрегацию. Поэтому в дальнейшей работе мольный избыток белка не превышал указанного. В выбранных условиях (7 мМ Mg²⁺, 300 мМ NH₄Cl) полученный комплекс был в полтора раза более стабильный, чем описанный ранее в условиях интегральной реконструкции рибосом, кажущаяся константа диссоциации была 70 нМ против 100 нМ [8].

Первый делеционный вариант исходного фрагмента мРНК представляет собой весь межцистронный район с предполагаемой вторичной структурой в виде составной шпильки, ограниченной в основании терминирующим кодоном белка S12 и инициаторным кодоном белка S7 (рис. 4, Б). РНК транскрибировали с матричной ДНК, полученной ПЦР с помощью праймеров, левый (первый) из которых содержал некоплементарный участок с последовательностью промотора фага T7 (подчеркнута):

5'-GACGAATTCTAATACGACTCACTATA–

–TTAATGGTTCTCCGTTAAG-3'

5'-CATGGAAATACCGTTG-3'

Синтезированная РНК имеет длину 103 нуклеотида, делеция происходит за счет 3'-концевой части кодирующей последовательности цистрона белка S7. Укороченный

фрагмент мРНК связывал белок несколько хуже, чем исходный фрагмент. Наиболее сильные различия наблюдались для температурного режима ренатурации РНК, что может указывать на конформационную вариабельность этого фрагмента РНК: значения связывания изменялись в 2–3 раза. Это предполагает, что при делеции 3'-концевых 39 нуклеотидов цистрона белка S7 может происходить потеря не столько структурных элементов РНК, необходимых для связывания белка S7, сколько потеря участка молекулы РНК, отвечающего за стабильность его структуры. В настоящее время не представляется возможным однозначно указать причину падения эффективности связывания для данного фрагмента РНК.

Второй делеционный фрагмент межцистронной области мРНК представляет собой верхнюю половину шпильки (рис. 4, В), для которого Номурой были найдены характерные изменения в химической модификации при связывании белка [4]. Он ограничен предполагаемым Номурой дефектом вторичной структуры между двутяжевыми участками II и III (рис. 1, А), что могло бы его структурно обособливать. Матричную ДНК для транскрипции получали ПЦР со следующими праймерами:

5'-GACGAATTCTAATACGACTCACTATA–

GTAAGGCCAAACGTTTAAAC-3'

5'-CAAGC-TTCAGGATTGTCCAAAAC-3'

(Некоплементарная часть второго праймера, выделенная курсивом, служит для создания участка рестрикции.) Белок S7 практически не связывался с этим фрагментом мРНК, значения удержания всего в два раза превышали фоновые (рис. 4, В). Это означает, что либо локализованный Номурой участок связывания белка имеет более протяженные размеры, либо для поддержания его правильной (для связывания) конформации требуются дополнительные структурные элементы РНК, прямо не вовлеченные во взаимодействие с белком.

Именно поэтому был проведен теоретический анализ всех возможных вариантов вторичной структуры исходного фрагмента РНК длиной 146 нуклеотидов стандартным матричным методом [10]. При моделировании задавалась максимально возможная степень стэкинг-взаимодействий, поэтому шпилька V была развернута коаксиально к основной двутяжевой структуре. Центральный дефект молекулы между шпильками II и III также имеет возможность дополнительной стабилизации за счет образования двутяжевой структуры, допуская образование G–A-пар, которые уже не являются редкостью при построении моделей вторичной структуры рРНК [2] (рис. 1, Б). Наиболее характерной особенностью данного фрагмента мРНК является возможность образования альтернативных структур типа псевдоузла (рис. 1, В). Если предположить, что такие структуры образуются, то наблюдаемые экспериментальные данные могут получить разумное объяснение. Отсутствие 39 нуклеотидов на 3'-конце фрагмента мРНК длиной

103 нуклеотида по сравнению с исходным фрагментом позволяет образовать только «левый» псевдоузел петли шпильки IV с дефектом основного стебля структуры. Однако при этом теряется возможность образования второго, «правого» псевдоузла, который может стабилизировать исходный фрагмент РНК (рис. 4, Б). Конформация укороченного фрагмента РНК в растворе будет нестабильной, связывание с белком уменьшается, но не исчезает совсем. Еще более короткий 63-нуклеотидный фрагмент РНК сохраняет элементы вторичной структуры, защищаемые белком [4], но не может образовать псевдоузел (рис.4, В), что, по-видимому, объясняет резкое сни-

жение связывания с белком. Это косвенно подтверждает предположение о том, что белку может быть недостаточно элементов вторичной структуры и для узнавания РНК он нуждается в сложной третичной структуре псевдоузла.

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ 98-04-49005 и Университеты России 5099 и 5157.

Авторы выражают искреннюю благодарность А.В. Каргинову за выделение белка, С. Н. Кочеткову за препараты РНК-полимеразы фага T7, С.А. Копылову за программу матричного анализа, В. Рамакришнану за полезные дискуссии, Б. Виттманн-Либольд и А. А. Богданову за поддержку и помощь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zengel J.M., Lindahl L. // *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1994. **47**. P. 331.
2. Samaha R.R., O'Brian B., O'Brian T.W., Noller H.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. **91**. P. 7884.
3. Dragon F., Brakier-Gingras L. // *Nucleic Acids Res.* 1993. **21**. P. 1199.
4. Saito K., Nomura M. // *J. Mol. Biol.* 1994. **235**. P. 125.
5. Wimberly B.T., Whiteф S.W., Ramakrishnan V. // *Structure* 1997. **5**. P. 1187.
6. Hosaka H., Nakagawa A., Tanaka I., Harada N., Sano K., Kimura M., Yao M., Wakatsuki S. // *Structure.* 1997. **5**. 1199.
7. Tanaka I., Nakagawa A., Hosaka H., Wakatsuki S., Mueller F., Brimacombe R. // *RNA.* 1998. **4**. P. 542.
8. Spiridonova V.A., Golovin A.V., Drygin D.Yu., Kopylov A.M. // *Biochem. Mol. Biol. International* 1998. **44**. P. 1141.
9. Karginov A.V., Karginova O.A., Spiridonova V.A., Kopylov A.M. // *FEBS Lett.* 1995. **369**. P. 158.
10. Копылов А. М. // *Итоги науки и техники. Биологическая наука.* ВИНТИ. Т. 15. М., 1981. P. 38.

Поступила в редакцию 13.10.98