

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ФРАГМЕНТА ПОЛИОВИРУСНОГО IRES-ЭЛЕМЕНТА, НЕОБХОДИМОГО ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА С ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ГЛИЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗОЙ

© 2016 г. Е.Ю. Никонова, А.О. Михайлина, Н.В. Леконцева, О.С. Никонов, В.Г. Кляшторный, О.В. Кравченко, Д.Е. Андреев\*, И.Н. Шатский\*, М.Б. Гарбер

*Институт белка РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 4;*

*\*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1/40*

*E-mail: kattya\_nik@vega.protres.ru*

Поступила в редакцию 18.11.15 г.

Аминоацил-тРНК-синтетазы – древнее семейство ферментов, которые специфически заряжают молекулу тРНК соответствующей аминокислотой для белкового синтеза. Глицил-тРНК-синтетаза отличается вариабельностью своей структуры и особенностями функционирования в разных организмах. Недавние исследования показали, что глицил-тРНК-синтетаза человека является регулятором инициации трансляции мРНК полиовируса. Детали данного процесса и его механизм остаются неизвестными. В рамках исследований, посвященных изучению этого этапа функционирования полиовируса, мы изучили взаимодействие цитоплазматической формы глицил-тРНК-синтетазы человека, а также ее доменов с фрагментами полиовирусного IRES-элемента. В результате мы определили минимальный фрагмент вирусной мРНК, с которым полноценно взаимодействует глицил-тРНК-синтетаза, и оценили вклад отдельных доменов во взаимодействие глицил-тРНК-синтетазы с РНК.

*Ключевые слова: энтеровирусы, полиовирус, инициация трансляции, глицил-тРНК-синтетаза, сайт внутренней посадки рибосомы, РНК-белковые взаимодействия.*

Участки внутренней посадки рибосомы (IRES-элементы) – это специфические структурные элементы РНК, располагающиеся в 5'-нетранслируемой области мРНК, на которых происходит кэп-независимая инициация ее трансляции. Изначально они были описаны у пикорнавирусов [1], а позже найдены и в мРНК вирусов из других семейств. IRES-элементы пикорнавирусов классифицируются в зависимости от их вторичной структуры. Выделяют четыре типа этих элементов: тип I (в мРНК энтеровирусов и риновирусов), тип II (такие, как в мРНК вирусов энцефаломиокардита, Тейлера и ящура), тип III (в мРНК вируса гепатита А) и тип IV (в мРНК тешовируса) [2]. Несмотря на активное изучение IRES-элементов типа I [2,3], до сих пор нет ясного понимания механизма их функционирования. По-видимому, определены далеко не все участники кэп-независимой инициации трансляции на этом типе IRES-элементов. Лишь недавно был обнаружен новый компонент, необходимый

для эффективной трансляции полиовирусной РНК, – глицил-тРНК-синтетаза [4]. Как оказалось, этот «хозяйский» фермент специфически связывается с пятым доменом IRES-элемента полиовирусной мРНК, регулируя ее трансляцию на этапе инициации.

Имеющаяся на данный момент информация позволяет предположить, что специфическое взаимодействие глицил-тРНК-синтетазы с IRES-элементами энтеровирусов и риновирусов может быть использовано в качестве мишени при борьбе с соответствующими заболеваниями. Кроме того, РНК-связывающая активность глицил-тРНК-синтетазы, позволяющая ей активно взаимодействовать не только с тРНК, вызывает большой интерес в связи с тем, что ген, кодирующий глицил-тРНК-синтетазу, ассоциирован с различными нейродегенеративными заболеваниями, в том числе с синдромом Шарко–Мари–Тута, затрагивающим функции периферической нервной системы [5]. В большинстве случаев при этом синдроме классическая (тРНК-синтетазная) активность продукта мутантного гена не нарушена и проявления

Сокращения: IRES (Internal Ribosome Entry Site) – участки внутренней посадки рибосомы.

заболевания связаны с некой нейрон-специфичной ролью глицил-тРНК-синтетазы, которая, возможно, и обусловлена ее способностью взаимодействовать с мРНК различной природы. Таким образом, обнаружение у глицил-тРНК-синтетазы функции регуляции трансляции специфических мРНК может пролить свет и на ее роль в подобных заболеваниях.

Данная работа посвящена изучению РНК-связывающих свойств глицил-тРНК-синтетазы с фрагментом полиовирусного IRES-элемента и является началом серии исследований в этом направлении.

5'-нетранслируемый участок мРНК полиовируса содержит шесть доменов, II–VI из которых образуют IRES-элемент первого типа. Наиболее важную роль в функционировании этого элемента играют домены IV и V [2,3]. Домен V связывает комплекс инициаторных факторов (eIF4G и eIF4A), опосредующих взаимодействие с 40S-рибосомной субчастицей [6,7], а также фактор eIF4B, активирующий хеликазную активность eIF4A [8]. Мутации в этом домене влияют на способность полиовируса поражать нейроны [7–9]. Согласно существующей на сегодняшний день модели 40S-рибосомная субчастица в комплексе с каноническими инициаторными факторами и инициаторной Met-тРНК связывает IRES-элемент полиовируса в районе доменов V и VI и кратковременно узнает AUG-триплет (в позиции 586 у полиовируса). Однако инициации трансляции с этого (586 AUG) кодона не происходит. Трансляция иницируется на следующем (743 AUG) кодоне, находящемся от первого на расстоянии 160 нуклеотидов [10].

Предположительно участок связывания человеческой глицил-тРНК-синтетазы на IRES-элементе типа I располагается в непосредственной близости от места связывания факторов eIF4G+eIF4A [6,7]. Верхняя часть домена V, расположенная в непосредственной близости от участка связывания ключевого канонического инициаторного фактора eIF4G, имитирует антикодоновую шпильку глициловой тРНК и содержит глициновый «антикодон» ACC. От антикодоновой петли глициловой тРНК «антикодоновая петля» данного участка вирусной мРНК отличается тем, что содержит на один нуклеотид больше. Аналогичные структуры присутствуют во всех IRES-элементах типа I. Показано, что мутация этого «антикодона» приводит к драматическому падению активности полиовирусного IRES-элемента, а делеция антикодонсвязывающего домена глицил-тРНК синтетазы лишает ее свойства стимулировать трансляцию мРНК полиовируса [4].

Нашей задачей было определить минимальный фрагмент IRES-элемента, необходимый и достаточный для связывания с глицил-тРНК-синтетазой человека, а также определить константы их связывания. Мы остановили свой выбор на двух фрагментах полиовирусного IRES-элемента: 35 н (содержащий нуклеотиды с 482 по 510) и 65 н (содержащий нуклеотиды с 474 по 531). Оба они содержали «антикодоновую» петлю и прилегающую к ней шпильку, а наиболее длинный вариант содержал еще и петлю, в районе которой предположительно связывается комплекс факторов eIF4G и eIF4A [6]. Исходя из полученных нами данных, нет значительной разницы в константах связывания глицил-тРНК синтетазы человека с 35 и 65 н фрагментом, что говорит в пользу того, что основной участок связывания глицил-тРНК-синтетазы находится в районе апикальной петли домена V полиовирусного IRES-элемента. Таким образом, 35 н фрагмент полиовирусного IRES-элемента может быть использован для дальнейших структурных исследований, что, возможно, упростит получение пригодных для рентгеноструктурного анализа кристаллов в сравнении с более крупными и более мобильными фрагментами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клонирование генов белка глицил-тРНК-синтетазы *H. sapiens* и ее мутантных форм; выделение белков в препаративных количествах.** Ген человеческой глицил-тРНК-синтетазы, а также ген мутантной формы с удаленным WHER доменом ( $\Delta$ WHER) были клонированы в экспрессионный вектор pET22b. Матрицей для ПЦР была плаزمида pGEX-6p1GARS. Для ПЦР мы использовали праймеры

5' GGAATTCCATATGGACGGCGCGGGGGCTGAGG3' (прямой для полноразмерного белка),  
 5' GGAATTCCATATGCCCAAAGATGATATTTGTAGACCGAGCAAAAATGGAAG3' (прямой для  $\Delta$ WHER) и  
 5' TTGCACTTCTCGAGTTCSTCGATTGTCTCTTTTТТАССАГТСТСТТГССС3' (обратный),

несущие сайты для эндонуклеаз рестрикции – FauNDI и XhoI соответственно. Нуклеотидная последовательность клонированного гена была проверена секвенированием.

Гены полноразмерной глицил-тРНК-синтетазы и ее мутантной формы были экспрессированы в штамме-суперпродуценте *E. coli* BL21(DE3). Во избежание ошибочного включения аминокислот в эукариотический белок клетки данного штамма были котрансформированы плазмидой Rosetta [11].

Клеточную культуру выращивали при 37°C с интенсивным перемешиванием (160 об/мин) на богатой среде LB, содержащей 100 мкг ампицилина и 30 мкг хлорамфеникола на 1 мл среды, до оптической плотности  $D_{590} = 0,8$ . Для активации T7-РНК-полимеразы в среду добавляли изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 0,3 мМ. После добавления индуктора клетки инкубировали при 20°C в течение 17 ч. Клетки собирали центрифугированием (8000 g, 20 мин, 4°C). Биомассу ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола, фенолметилсульфонилфторид) и разрушали ультразвуком в течение 20 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 14000 g. Супернатант разводили в четыре раза и наносили на колонку со смолой «Q-сефароза», уравновешенную буфером 50 мМ трис-НСl рН 8,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола. Для элюции белка использовали линейный градиент хлорида натрия от стартового буфера до 800 мМ NaCl. Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, объединяли, диализовали против буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl рН 8,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола, и наносили на колонку со смолой «гепарин-сефароза». Для элюции белка использовали линейный градиент хлорида натрия от стартового буфера до 600 мМ NaCl. Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, объединяли и наносили на гель-фильтрационную колонку со смолой «Superdex G-200». Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, объединяли и концентрировали.

Последовательность антикодонсвязывающего домена (ABD) глицил-тРНК-синтетазы человека была клонирована в экспрессионный вектор рЕТ11а-PL. Матрицей для ПЦР была плаزمида рGEX-6p1GARS. Для ПЦР мы использовали праймеры

5' CGAATTCCATATGACATTCCATGTACGAGAAGG  
AGATGAACAGAGAAC3' (прямой) и  
5' СААТАТГААТТСТТАТТССТСГАТТГТСТТТ  
ТТАССАГТСТСТТГССС3' (обратный),

несущие сайты для эндонуклеаз рестрикции FauNDI и EcoRI соответственно. Нуклеотидная последовательность клонированного участка была проверена секвенированием. Экспрессию ABD

домена осуществляли так же, как описано выше для полноразмерной глицил-тРНК-синтетазы.

Биомассу ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола, фенолметилсульфонилфторид) и разрушали ультразвуком в течение 20 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 14000 g. Супернатант разводили в четыре раза и наносили на колонку со смолой «Q-сефароза», уравновешенную буфером 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола. Для элюции белка использовали линейный градиент хлорида натрия от стартового буфера до 800 мМ NaCl. Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, объединяли, диализовали против буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl, рН 9,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола, и повторно наносили на колонку со смолой «Q-сефароза», уравновешенную буфером с рН 9,0. Для элюции белка использовали линейный градиент хлорида натрия от стартового буфера до 600 мМ NaCl. Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, объединяли и наносили на гель-фильтрационную колонку со смолой «Superdex G-75». Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, объединяли и концентрировали до концентрации 40 мг/мл.

#### Получение фрагментов IRES-элементов.

Нуклеотидные последовательности, соответствующие фрагментам IRES-элемента полиовируса, были клонированы в вектор рUC18. Для ПЦР мы использовали следующие праймеры:

5' СТАСТGCAAAGСТТААТАСГАСТСАСТАТАGGG  
CAGGTGGTCACAAACCAGTГАТТGG3' (прямой),  
5' TCACAGTACCCGGGCAGGCCAATCACTGGTTG  
TGACCACСТG3' (обратный) и  
5' СТАСТGCAAAGСТТААТАСГАСТСАСТАТАGGG  
CCTCGGAGCAGGTGGTCACAAACCAGTГАТТGGC  
СТG3' (прямой),  
5' TCACAGTACCCGGGCCACGGACTTGCГCGTTAC  
GACAGGCCAATCACTGGTTTGTGACCACСТG3'  
(обратный).

Прямые праймеры содержали сайт для эндонуклеазы рестрикции HindIII, а обратные праймеры – для эндонуклеазы рестрикции SmaI. Нуклеотидные последовательности клонированных участков были проверены секвенированием.

Все фрагменты РНК были получены с лиnearизованных плазмид транскрипцией *in vitro*

с помощью РНК-полимеразы T7. Очистку фрагментов РНК осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 8 М мочевины с последующей элюцией из геля и очисткой на анионообменной смоле. Полученные фрагменты РНК лигировали с помощью РНК-лигазы с биотинилированным фрагментом РНК.

**Кинетические эксперименты.** Мониторинг взаимодействия глицил-тРНК-синтетазы с фрагментами IRES-элемента I типа осуществляли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса на приборе ProteOn XPR36 (Bio-Rad, США). Эксперименты проводили при 25°C. Биотинилированные фрагменты РНК иммобилизовали на сенсорный чип, покрытый авидином. Концентрации белка, соответствующие каждой сенсограмме, различались не менее чем в три раза. Скорость потока жидкости, содержащей белок, составляла 30 мкл/мин. Фаза ассоциации длилась 300 с, а последующая фаза диссоциации – 300–1200 с. По окончании каждого цикла поверхность чипа регенерировали, пропуская через него 0,1% раствор додецилсульфата натрия, чтобы добиться полной диссоциации белка с поверхности РНК. Кинетический анализ проводили используя четыре–пять сенсограмм для одностадийной реакции с помощью обсчета (по Лангмюру) с коррекцией масс-транспорта. Обсчет каждого набора данных давал нам константы ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ), а также рассчитываемую из них равновесную константу диссоциации ( $K_D = k_d/k_a$ ).

**Моделирование структур и молекулярно-динамические исследования.** Молекулярно-динамическое моделирование выполнено в программе Gromacs 4.5.3 [12] с использованием полноатомных силовых полей Charmm27 [13]. Длины ковалентных связей с участием атомов водорода ограничивали с помощью алгоритма LINCS [14], что позволило использовать шаг интегрирования 2 фс. Электростатические взаимодействия рассчитывали с помощью метода Эвальда (PME, Particle Mesh Ewald) [15,16]. Для описания вандер-ваальсовых взаимодействий использовали функции сглаживания «switch» в интервале 10–12 Å. Температуру в моделируемой системе поддерживали постоянной (300 К) с помощью алгоритма (термостата) шкалирования атомных скоростей ( $\nu$ -rescale) [12]. Давление в этом эксперименте поддерживали на уровне 1 атм с помощью баростата Берендсена [17].

В качестве стартовой модели для молекулярной динамики использовали пространственную структуру комплекса ABD-домена глицил-тРНК-синтетазы с 29-нуклеотидным фрагментом IRES-элемента, полученную методом го-

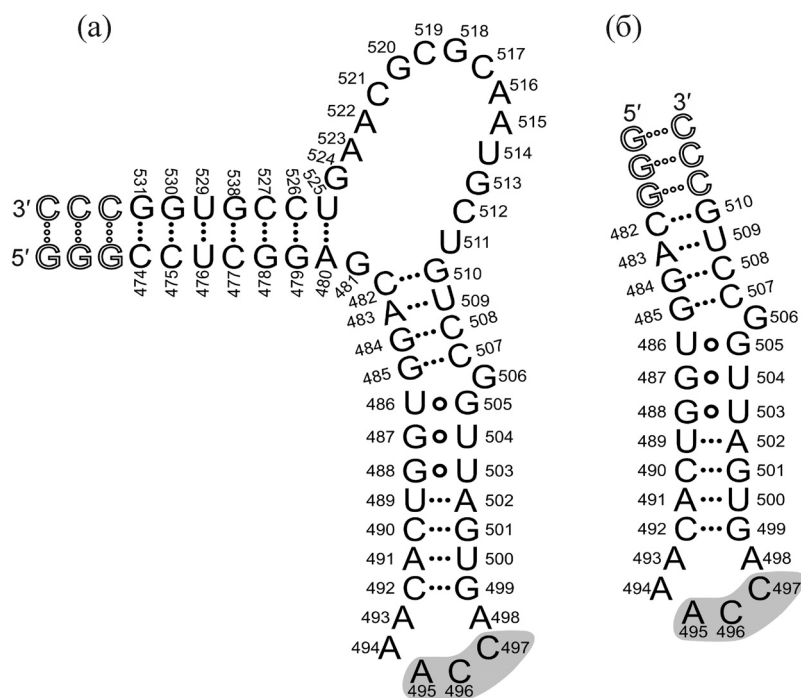
мологичного моделирования на основе известной структуры комплекса глицил-тРНК-синтетазы с тРНК (PDB code: 4KR3).

Стартовая модель комплекса была помещена в орторомбический водный бокс размерами  $72 \times 82 \times 88$  Å, который содержал около 16000 молекул воды типа TIP3 [18] и 33 иона  $\text{Na}^+$ . Водный бокс был сформирован таким образом, чтобы обеспечить по крайней мере 15 Å растворителя от поверхности комплекса до края бокса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее в нашем распоряжении была плазмида pGEX-6p1GARS, несущая ген человеческой глицил-тРНК-синтетазы [4]. При экспрессии данного гена белок нарабатывался практически полностью в нерастворимой форме, и его не удавалось выделить в препаративных количествах с чистотой, пригодной для кристаллизации. Поэтому мы перенесли ген глицил-тРНК-синтетазы в другой экспрессионный вектор (pET22b). Целевой рекомбинантный белок соответствует цитоплазматической версии глицил-тРНК-синтетазы, т.е. не содержит N-концевую сигнальную последовательность, необходимую для импорта белка в митохондрии. Цитоплазматическая форма состоит из трех доменов: неструктурированного WHER-домена, каталитического корового домена и антикодон-связывающего ABD-домена. Ранее было показано, что способность стимулировать трансляцию как у полноразмерного фермента, так и у его варианта с отрезанным WHER-доменом одинакова [4]. Удаление же ABD-домена приводит к потере способности усиливать инициацию трансляции [4]. Чтобы исключить негативное влияние подвижного неструктурированного N-концевого домена белка на кристаллизацию, мы получили укороченный вариант глицил-тРНК-синтетазы, содержащий только домены 2 и 3, необходимые для функционирования белка. Кроме того, мы получили изолированный ABD-домен. Это небольшой компактный домен, который в составе синтетазы необходим для взаимодействия с нуклеотидами антикодона тРНК. Мы предполагали, что изолированный ABD-домен будет, возможно, связывать РНК так же, как и полноразмерный белок. Для всех вариантов белка (глицил-тРНК-синтетаза и ее укороченные формы) были подобраны оптимальные условия наработки и разработаны схемы выделения.

Ранее методом гель-электрофореза нуклеиновых кислот в неденатурирующих условиях мы показали, что глицил-тРНК-синтетаза спо-



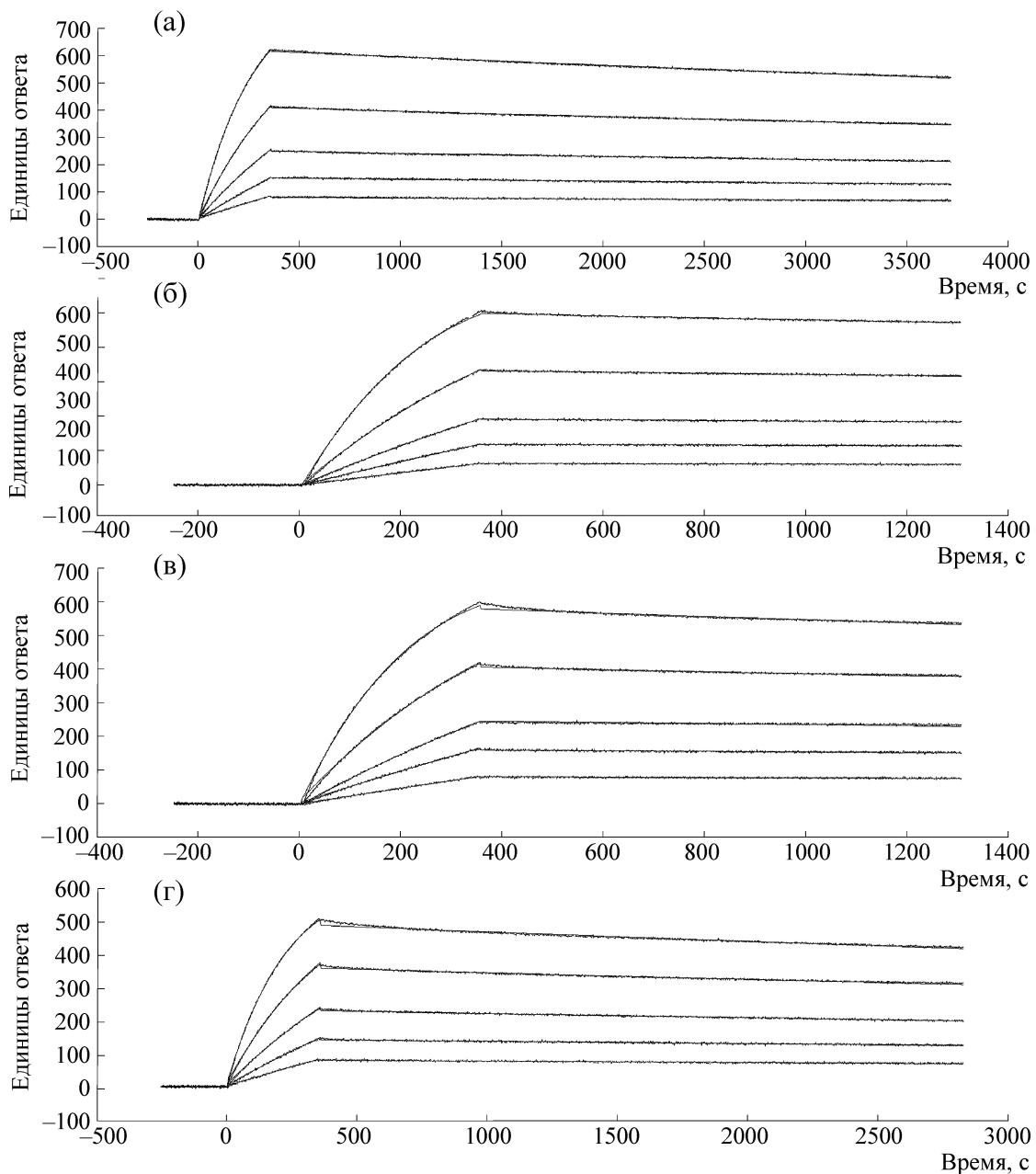
**Рис. 1.** Предсказанная вторичная структура фрагментов полиовирусного IRES-элемента: (а) – фрагмент 65 н, (б) – фрагмент 35 н. Три G–С-пары, добавленные искусственно для повышения стабильности синтезированного фрагмента, связывают 5'- и 3'-концы фрагментов. «Антикодон» выделен серым цветом.

собна образовать комплекс с 35 н фрагментом полиовирусной РНК [19].

Для оценки сродства глицил-тРНК-синтетазы и ее доменов к целевым фрагментам вирусной мРНК различной длины и специфичности РНК-белковых взаимодействий в полученных комплексах мы провели их кинетические исследования с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса. Для этого мы получили два фрагмента IRES-элемента (рис. 1), которые содержали необходимый «антикодон» и отличались лишь длиной шпильки. В экспериментах по связыванию с РНК использовали цитоплазматическую форму глицил-тРНК-синтетазы, а также ее укороченные формы. Сенсограммы, демонстрирующие связывание полноразмерного белка и его укороченных форм с двумя фрагментами IRES-элемента, приведены на рис. 2. На основании этих сенсограмм были определены кинетические константы для этих комплексов (таблица). В ходе работы было проверено влияние солевых условий на образование и стабильность комплексов. Из таблицы видно, что полноразмерная цитоплазматическая форма глицил-тРНК синтетазы связывает фрагмент полиовирусной мРНК примерно с тем же сродством, что и ее двухдоменная форма. Однако полученный нами изолированный

ABD-домен вообще не связывал РНК, что явилось неожиданностью для нас. Удлинение шпильки фрагмента РНК не вносит значительного вклада в узнавание или стабильность комплекса.

Для структурной интерпретации и анализа некоторых результатов кинетических исследований РНК-белковых взаимодействий глицил-тРНК-синтетазы с фрагментами мРНК нами были сконструированы модели изолированного ABD-домена и комплекса ABD-домена с 29-нуклеотидным фрагментом IRES элемента. В качестве исходного материала для этих моделей послужила структура комплекса глицил-тРНК-синтетазы с тРНК (PDB code: 4KR3). Сконструированная нами модель фрагмента IRES-элемента, входящего в состав моделируемого комплекса, отличается по составу от использованного в экспериментах по связыванию 35 н фрагмента IRES отсутствием трех Г–Ц-пар, связывающих 5'- и 3'-концы последнего. Эти пары нуклеотидов были добавлены искусственно для повышения стабильности синтезированного фрагмента. Был проведен расчет 100-наносекундных молекулярно-динамических траекторий для смоделированных объектов, в ходе которого они сохранили свои структуры практически неизменными.



**Рис. 2.** Сенсограммы, показывающие взаимодействие глицил-тРНК-синтетазы с фрагментами полиовирусного IRES-элемента. (а) – Взаимодействие глицил-тРНК-синтетазы при различных концентрациях (снизу вверх: 62,5–1000 нМ) с иммобилизованным на поверхности чипа 65 н фрагментом РНК; (б) – взаимодействие  $\Delta$ WHER при различных концентрациях (снизу вверх: 62,5–1000 нМ) с иммобилизованным на поверхности чипа 65 н фрагментом РНК; (в) – взаимодействие глицил-тРНК-синтетазы при различных концентрациях (снизу вверх: 125–2000 нМ) с иммобилизованным на поверхности чипа 35 н фрагментом РНК; (г) – взаимодействие  $\Delta$ WHER при различных концентрациях (снизу вверх: 125–2000 нМ) с иммобилизованным на поверхности чипа 35 н фрагментом РНК.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже упоминалось выше, цитоплазматическая форма глицил-тРНК-синтетазы человека состоит из трех доменов: WHER-домена, каталитического корового домена и ABD-домена. Наличие WHER-домена является характерной

чертой пяти тРНК-синтетаз – триптофановой, гистидиновой, глутамат-пролиновой, глициновой и метиониновой. Название этого домена образовано буквами однобуквенного кода для аминокислот, которые являются субстратами для трех из пяти вышеперечисленных фермен-

Равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) комплексов глицил-тРНК-синтетазы с фрагментами полиовирусного IRES-элемента

	$K_D$ , нМ		
	Глицил-тРНК-синтетаза	$\Delta WHER$	ABD-домен
35 н РНК, 350 мМ NaCl	27,5 ± 1,9	25,6 ± 2,2	Не детектируется
35 н РНК, 150 мМ NaCl	8,3 ± 1,2	12,7 ± 1,5	Не детектируется
65 н РНК, 350 мМ NaCl	12,7 ± 1,4	10,0 ± 1,1	Не детектируется

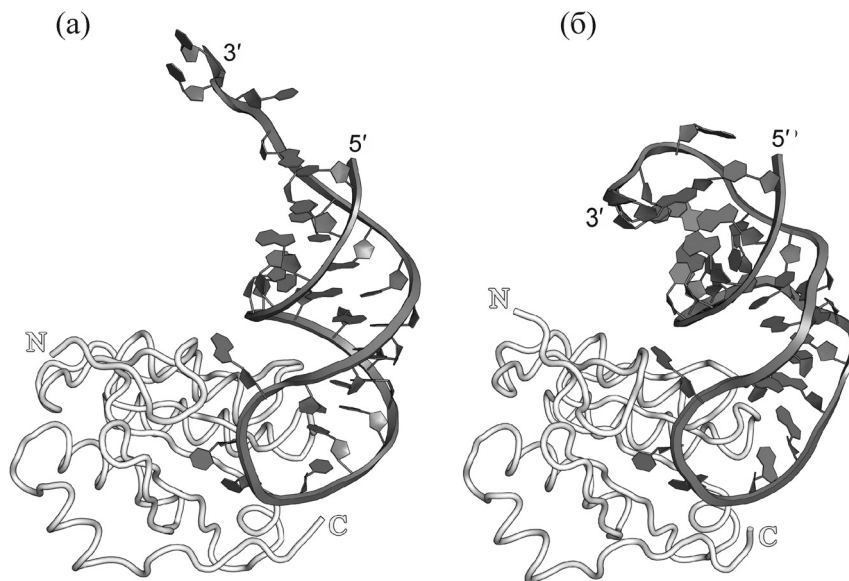
тов. Этот домен присутствует у аминоацил-тРНК-синтетаз многоклеточных животных и отсутствует в аналогичных ферментах из других организмов [20]. Этот домен имеет конформацию *helix-tern-helix*, является неспецифическим РНК-связывающим доменом, взаимодействует с ДНК и участвует в белок-белковом взаимодействии [21]. Интересен тот факт, что удаление WHER-домена не сказывается на энзиматических функциях тРНК-синтетаз [20,21], указывая на то, что роль этого домена не связана с аминоацилированием. Кроме того, недавно было показано, что полноразмерная глицил-тРНК-синтетаза способна стимулировать трансляцию так же, как и ее фрагмент с отрезанным WHER-доменом ( $\Delta WHER$ ) [4]. Так как WHER-домен является подвижным доменом и может в дальнейшем мешать при кристаллизации, мы получили укороченный вариант глицил-тРНК-синтетазы ( $\Delta WHER$ ) и оценили его способность связывать фрагмент полиовирусного IRES-элемента. Проведенные нами кинетические эксперименты подтвердили, что  $\Delta WHER$  взаимодействует с фрагментом полиовирусного IRES-элемента так же, как и полноразмерная глицил-тРНК-синтетаза, что дает нам возможность использовать укороченный вариант белка для структурных исследований.

Основной задачей данной работы было определение минимальной длины фрагмента IRES-элемента, необходимой и достаточной для связывания с глицил-тРНК-синтетазой человека. Два фрагмента полиовирусного IRES-элемента – 35 н (нуклеотиды 482–510) и 65 н (нуклеотиды 474–531) – содержат «антикодоновую» петлю и прилежащую к ней шпильку, а наиболее длинный вариант содержит еще и петлю, в районе которой предположительно связывается комплекс факторов eIF4G и eIF4A [6]. Как показали кинетические исследования соответствующих комплексов (таблица), сродство полноразмерной глицил-тРНК-синтетазы в одинаковых солевых условиях к фрагменту 35 нт лежит в наномолярном диапазоне и всего лишь в два раза слабее, чем к фрагменту 65 нт. Таким образом, фрагмент 35 н полиовирусного IRES-элемента может быть ис-

пользован для дальнейших структурных исследований, что, вероятно, упростит получение пригодных для рентгеноструктурного анализа кристаллов в сравнении с более крупными и, возможно, более гибкими фрагментами. Дальнейшее уменьшение длины фрагмента вряд ли целесообразно, так как оно может затронуть его функционально важный участок.

Для упрощения и облегчения получения РНК-белкового комплекса в данной работе был также проведен поиск минимального фрагмента белка. Мы показали, что удаление WHER домена, как и предполагалось, не влияет на связывание фрагментов IRES-элемента. Из оставшихся двух доменов ABD-домен глицил-тРНК-синтетазы, как следует из его названия (*anticodon binding domain*), является антикодонсвязывающим доменом. Показано, что удаление этого домена ( $\Delta ABD$ ) приводит к потере способности глицил-тРНК-синтетазы стимулировать трансляцию мРНК полиовируса [4]. Принимая во внимание эти данные, а также основываясь на имеющейся структуре комплекса  $\Delta WHER$ -тРНК [22], мы предположили, что именно ABD-домен вносит основной вклад в связывание фрагмента IRES-элемента и, возможно, сохранит эту способность в изолированной форме. По литературным данным, ABD-домен включает в себя остатки 611–739 [22]. Однако, проанализировав участок взаимодействия глицил-тРНК-синтетазы с антикодоном тРНК в комплексе  $\Delta WHER$ -тРНК [22], мы решили добавить к ABD-домену  $\beta$ -шпильку, расположенную между ABD- и коровым доменами (остатки 591–611), так как аминокислоты, входящие в ее состав, принимают участие в формировании РНК-белкового интерфейса в комплексе глицил-тРНК-синтетазы с тРНК. Однако полученный нами изолированный ABD-домен не образовывал комплекс ни с одним из имеющихся у нас в распоряжении фрагментов IRES-элемента.

Анализ имеющейся структурной информации говорит о том, что изолированный ABD-домен должен иметь достаточно стабильную глобулярную структуру, аналогичную его структуре в составе целого белка. Используя метод гомологичного моделирования, мы также создали мо-



**Рис. 3.** (а) – Фрагмент структуры  $\Delta$ WHER с тРНК (PDB code 4KR3), использованной в качестве базовой модели при гомологичном моделировании комплекса ABD-домена с 29 н фрагментом IRES-элемента; (б) – модель комплекса ABD-домена с 29 н фрагментом РНК в конце 100 нс молекулярно-динамической траектории.

дель IRES-элемента, основываясь на известных структурах глициловой тРНК. Были проведены молекулярно-динамические исследования как изолированного ABD-домена, так и его комплекса с фрагментом IRES-элемента. Эта работа подтвердила сделанные ранее выводы о том, что изолированный ABD-домен должен иметь стабильную структуру. Молекулярно-динамические исследования модельного комплекса также показали его высокую стабильность. РНК-белковые контакты в ходе расчета 100-наносекундной молекулярно-динамической траектории не только не ослабли, но и усилились, что привело к некоторой компактизации комплекса. Интересно, что модель «антикодоновой шпильки» IRES-элемента по своей структуре в ходе молекулярно-динамических расчетов стала ближе к шпильке тРНК, использованной в качестве базовой модели. Структура белка претерпела минимальные изменения (рис. 3).

Эти данные свидетельствуют о том, что, по всей видимости, неспособность полученного нами изолированного домена взаимодействовать с мРНК не связана со структурными изменениями самого ABD-домена. Более детальный анализ структуры глицил-тРНК-синтетазы показывает, что оставленная нами в составе ABD-домена  $\beta$ -шпилька не только участвует во взаимодействии с РНК, но также формирует часть междоменного гидрофобного ядра. В модели, использованной в молекулярно-динамических расчетах, эта шпилька образует поверхностное гидрофобное пятно и может сохранять свою

структуру. В растворе же пятна соседних молекул стремятся сблизиться, что может привести к димеризации белка и экранированию места связывания с мРНК. Трудности, возникшие при выделении этого фрагмента белка, косвенно подтверждают данное предположение. В настоящий момент мы работаем над получением другого варианта изолированного ABD-домена, лишённого этого недостатка.

## ВЫВОДЫ

В ходе наших исследований мы определили минимальный фрагмент полиовирусного IRES-элемента, необходимый для взаимодействия с глицил-тРНК-синтетазой: для образования прочного специфического комплекса необходимо и достаточно «антикодоновой» шпильки и прилегающей к ней спирали. Мы подтвердили, что WHER-домен не вносит значительного вклада во взаимодействие с мРНК. Теоретический анализ показал возможность образования прочного комплекса изолированного ABD-домена с фрагментом IRES-элемента, однако получить экспериментально этот комплекс пока не удалось, что может быть обусловлено белок-белковыми взаимодействиями, вызывающими димеризацию белка.

Выражаем благодарность А. Казакову (ИБП РАН, Пущино Московской области) за помощь в проведении кинетических экспериментов на базе Центра коллективного пользования ИБП РАН.



Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00028).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Pelletier and N. Sonenberg, *Nature* **334**, 320 (1988).
2. L. Balvay, R. Soto Rifo, E. P. Ricci, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 542 (2009).
3. M. Niepmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 529 (2009).
4. D. E. Andreev, J. Hirnet, I. M. Terenin, et al., *Nucl. Acids Res.* **40** (12), 5602 (2012).
5. H. J. Lee, J. Park, K. Nakhro, et al., *J. Peripher. Nerv. Syst.* **17**, 418 (2012).
6. S. de Brejne, Y. Yu, A. Unbehaun, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 9197 (2009).
7. K. Ochs, A. Zeller, L. Saleh, et al., *J. Virol.* **77**, 115 (2003).
8. K. Ochs, L. Saleh, G. Bassili, et al., *J. Virol.* **76**, 2113 (2002).
9. G. J. Belsham and R. J. Jackson, In: *Translational Control of Gene Expression*, Ed. by N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000), pp. 869–900.
10. R. Novy, D. Drott, K. Yaeger, and R. Mierendorf, *Newsletter of Novagene* **12**, 1 (2001).
11. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, and E. Lindahl, *J. Chem. Theory and Computation* **4**, 435 (2008).
12. A. D. Mackerell, Jr., M. Feig, and C. L. Brooks, *J. Comput. Chem.* **25**, 1400 (2004).
13. B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, et al., *J. Comput. Chem.* **18**, 1463 (1997).
14. T. Darden, D. York, and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98**, 10089 (1993).
15. U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, et al., *J. Chem. Phys.* **103**, 8577 (1995).
16. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, et al., *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).
17. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, et al., *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).
18. Е. Ю. Никонова, О. С. Никонов, Н. В. Леконцева и М. Б. Гарбер, *Национальная ассоциация ученых* **7** (12), 32 (2015).
19. C. Cerini, M. Semeriva, and D. Gratecos, *Eur. J. Biochem.* **244** (1), 176 (1997).
20. B. Cahuzac, E. Berthonneau, N. Birlirakis, et al., *EMBO J.* **19** (3), 445 (2000).
21. X. Qin, Z. Hao, Q. Tian, et al., *J. Biol. Chem.* **289** (29), 20359 (2014).

## Determination of the Minimal Fragment of the Poliovirus IRES Necessary for the Formation of a Specific Complex with the Human Glycyl-tRNA Synthetase

**E.Yu. Nikonova\*, A.O. Mihaylina\*, N.V. Lekontseva\*, O.S. Nikonov\*, V.G. Klyashtorny\*,  
O.V. Kravchenko\*, D.E. Andreev\*\*, I.N. Shatsky\*\*, and M.B. Garber\***

*\*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*\*\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119992 Russia*

Aminoacyl-tRNA synthetases are an ancient enzyme family that specifically charge a tRNA molecule with a cognate amino acid required for protein synthesis. Glycyl-tRNA synthetase is one of the most interesting aminoacyl-tRNA synthetases due to its structure variability and functional features in the different organisms. It was shown recently that human glycyl-tRNA synthetase is a regulator of translational initiation of poliovirus mRNA. Details of this process and its mechanism still remain unknown. While exploring this stage of poliovirus functioning we have studied the interaction of the cytoplasmic form of human glycyl-tRNA synthetase and its domains with the fragments of the poliovirus IRES element. As a result, we have identified the minimal fragment of viral mRNA with which glycyl-tRNA synthetase fully interacts and estimated the contribution of some domains to the interaction of glycyl-tRNA synthetase with RNA.

*Key words: enteroviruses, poliovirus, translational initiation, glycyl-tRNA synthetase, IRES, RNA-protein interaction*