

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.322.63

Посвящается памяти Б.К. Вайнштейна

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1
ИЗ БАКТЕРИИ *Aquifex aeolicus*© 2011 г. Е. Ю. Никонова, С. В. Тищенко, А. Г. Габдулхаков, А. А. Шкляева,
М. Б. Гарбер, С. В. Никонов, Н. А. Невская

Институт белка РАН, Пущино

E-mail: nevskaaya@protres.ru

Поступила в редакцию 24.02.2011 г.

Кристаллическая структура рибосомного белка L1 из бактерии *Aquifex aeolicus* определена методом молекулярного замещения и уточнена до $R_{cryst} = 19.4$, $R_{free} = 25.1\%$ при разрешении 2.1 Å. Белок состоит из двух доменов, соединенных гибкой перетяжкой. В полученной структуре домены сближены и образуют “закрытую” конформацию. Ранее такая конформация была обнаружена в структуре белка L1 из бактерии *Thermus thermophilus*, тогда как структуры архейных белков L1 и структуры всех белков L1 в РНК-связанном состоянии имеют “открытую” конформацию. Наличие “закрытой” конформации в структурах двух белков L1, кристаллизующихся в разных пространственных группах и принадлежащих разным бактериям, позволяет утверждать, что эта конформация является особенностью бактериальных белков L1 в свободном состоянии.

ВВЕДЕНИЕ

Рибосомный белок L1 независимо и специфически взаимодействует с 23S рРНК и является частью бокового выступа большой субчастицы рибосомы [1]. Этот белок обладает также второй функцией и способен выступать в роли белка-регулятора в бактериях и археях, связываясь со своей собственной мРНК [2, 3]. Так, в *E. coli* этот белок регулирует собственный синтез и синтез белка L11, а в археях – синтез белков L1, L10 и L12.

Кристаллические структуры с атомным разрешением белка L1 в свободном состоянии и в комплексах со специфическими фрагментами 23S рРНК или мРНК определены для одной из бактерий *Thermus thermophilus* (TthL1) [4–6] и нескольких архей: *Methanococcus jannaschii* (MjaL1) [7, 8], *Methanococcus thermolithotrophicus* (MthL1) [9] и *Sulfolobus acidocaldarius* (SacL1) [10]. Кроме того, недавно была определена структура белка L1 из *T. thermophilus* в составе рибосомы [11].

Белок L1 состоит из двух доменов, соединенных между собой гибкой перетяжкой, которая позволяет доменам изменять свое взаимное расположение. Все определенные структуры архейных белков L1 имеют так называемую “открытую конформацию”, в которой взаимное положение доменов таково, что РНК-связывающие участки оказываются доступными для молекул РНК. Иначе обстоит дело с бактериальным белком TthL1. В свободном состоянии он имеет “закрытую” конформацию, в которой домены сближены, и РНК-связывающие участки оказываются

недоступными для молекул РНК. В комплексах с фрагментами рРНК или мРНК этот белок имеет “открытую” конформацию, аналогичную той, что обнаруживается в архейных белках L1.

Для того чтобы выяснить, является ли такое поведение особенностью только TthL1 или оно свойственно и другим бактериальным белкам L1, была определена пространственная структура L1 из гипертермофильной бактерии *Aquifex aeolicus* (AaeL1) в свободном состоянии. В данной статье описана структура этого белка при разрешении 2.1 Å и проведено ее сравнение со структурой белка TthL1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование плазмиды. Ген белка AaeL1 из *AaeL1* клонирован в экспрессионный вектор pET11a-PL. Матрицей для ПЦР была геномная ДНК *A. aeolicus*. Для ПЦР были использованы праймеры: 5'GGAATTCCATATGGCTAGAAAGGGGTAAGAAATACATAGAAGCTTC3' (прямой) и 5'CAATATGATTCTTACGCAGCSTTTTCTTGAAGTTTCTTTAGAAC3' (обратный), несущие сайты для эндонуклеаз рестрикции FauNDI и EcoRI соответственно. Нуклеотидная последовательность клонированного гена проверена секвенированием.

Выделение белка. Ген белка AaeL1 был экспрессирован в штамме-суперпродуценте *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET11a-PL-AaeL1. Клетки штамма-суперпродуцента растили при температуре 37°C при интенсивном перемешивании на

среде LB до оптической плотности $OD_{590} = 0.5$ ОЕ. Для активации T7 РНК-полимеразы в среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.5 мМ. После добавления индуктора клетки инкубировались в тех же условиях еще в течение 3 ч.

Разрушение клеток проводили в лизирующем буфере (90 мМ Tris-HCl ($pH_{25^\circ C}$ 7.5), 800 мМ NaCl, 1 мМ Na_2 ЭДТА, 50 мМ $MgCl_2$, 15 мМ β -меркаптоэтанол, 0.1 мМ PMSF) на ультразвуковом дезинтеграторе Sonic Dismembrator 550 (Fisher Scientific, США). Из супернатанта низкоскоростным центрифугированием удаляли обломки клеточных стенок, а затем с помощью высокоскоростного центрифугирования удаляли рибосомы. Супернатант прогревали при $65^\circ C$ в течение 15 мин. Денатурированные термолабильные белки *E. coli* осаждали низкоскоростным центрифугированием. Перед ионообменной хроматографией препарат разводили буфером 50 мМ NaAc, pH 5.5 до конечной концентрации NaCl – 150 мМ. Образец наносили на колонку CM-Sepharose, предварительно уравновешенную буфером 50 мМ Na-ацетат, pH 5.5, 150 мМ NaCl. Элюцию белка проводили линейным градиентом концентрации хлорида натрия от 0.1 до 1 М в буфере 50 мМ Na-ацетат, pH 5.5. Фракции, содержащие белок, объединяли и диализовали против буфера 50 мМ Tris-HCl, $pH_{25^\circ C}$ 8.0, 100 мМ NaCl. Вторым этапом очистки белка была аффинная хроматография на Heparin-Sepharose. Образец белка наносили на колонку Heparin-Sepharose, предварительно уравновешенную буфером 50 мМ Tris-HCl, $pH_{25^\circ C}$ 8.0, 100 мМ NaCl. Элюцию белка проводили линейным градиентом концентрации хлорида натрия от 0.1 до 1 М в буфере 50 мМ Tris HCl, $pH_{25^\circ C}$ 8.0. Фракции, содержащие белок AaeL1, объединяли. Белок, отдиализованный в буфер 20 мМ Tris-HCl, $pH_{25^\circ C}$ 7.5, 60 мМ KCl, концентрировали до 11 мг/мл на ультрафильтрах (Centricon10).

Кристаллизация. Раствор белка смешивали с раствором № 20 Crystal ScreenTM, Hampton Research (25% ПЭГ 4К, 100 мМ Na-ацетатного буфера, pH 4.6, 200 мМ сульфата аммония) в соотношении 1:1. Висящие капли объемом 4 мкл уравнивали против того же раствора диффузией паров при температуре $12^\circ C$. Кристаллы в форме пластинок появлялись в каплях через 3–4 дня, через неделю они достигали размеров $800 \times 100 \times 30$ мкм. Перед замораживанием в жидком азоте кристаллы переносили в криораствор, содержащий 30% ПЭГ 4К, 100 мМ Na-ацетатного буфера, pH 4.6 и 200 мМ сульфата аммония.

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционные данные были собраны от одного кристалла на лабораторной рентгеновской установке, состоящей из генератора с вращающимся анодом Proteum X8, снабженного фокусирующей системой Montel 200 (фирма Bruker) и двумерного

Статистические характеристики дифракционного набора и кристаллографического уточнения рибосомного белка AaeL1

Статистика набора	
Пространственная группа	C_2
Параметры ячейки, Å, град	$a = 107.5, b = 37.5, c = 59.0,$ $\alpha = \gamma = 90.0, \beta = 110.3$
Длина волны, Å	1.54
Пределы разрешения, Å	28.67–2.1 (2.2–2.1)
Общее число отражений	41 540 (1933)
Число уникальных отражений	12 221 (1411)
Полнота, %	92.9 (83.3)
R_{merge} , %	9.8 (28.9)
Избыточность	3.39 (1.36)
Среднее $I/\sigma(I)$	11.94 (2.85)
Мозаичность, град	0.37
Статистика уточнения	
Диапазон разрешения, Å	28.7–2.1 (2.31–2.10)
Число молекул в асимметричной части	1
Число отражений	12 219 (611)
Размер тестовой выборки, %	5
R_{cryst} , %	19.4 (21.9)
R_{free} , %	25.1 (29.4)
Средний температурный фактор, Å ²	17.1
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, Å	0.008
Валентные углы, Å	1.146
Число остатков на карте Рамачандрана	
Наиболее предпочтительные районы, %	93.4
Дополнительно разрешенные районы, %	6.6

Примечание. Данные в скобках соответствуют интервалу наиболее высокого разрешения.

детектора MAR-345 (фирма MarResearch, Германия). При съемке данных напряжение генератора составляло 45 кВ, сила тока 40 мА, диаметр пучка 0.2 мм, расстояние кристалл-детектор 120 мм, угол осцилляции равен 0.75° . Набор обработан в программном комплексе XDS [12]. Характеристика дифракционных данных приведена в таблице. Кристаллы белка L1 из *A. aeolicus* принадлежат к гр. C_2 и отражают до 2.1 Å. Значение коэффициента Метьюза (V_m) попадает в разрешенную область

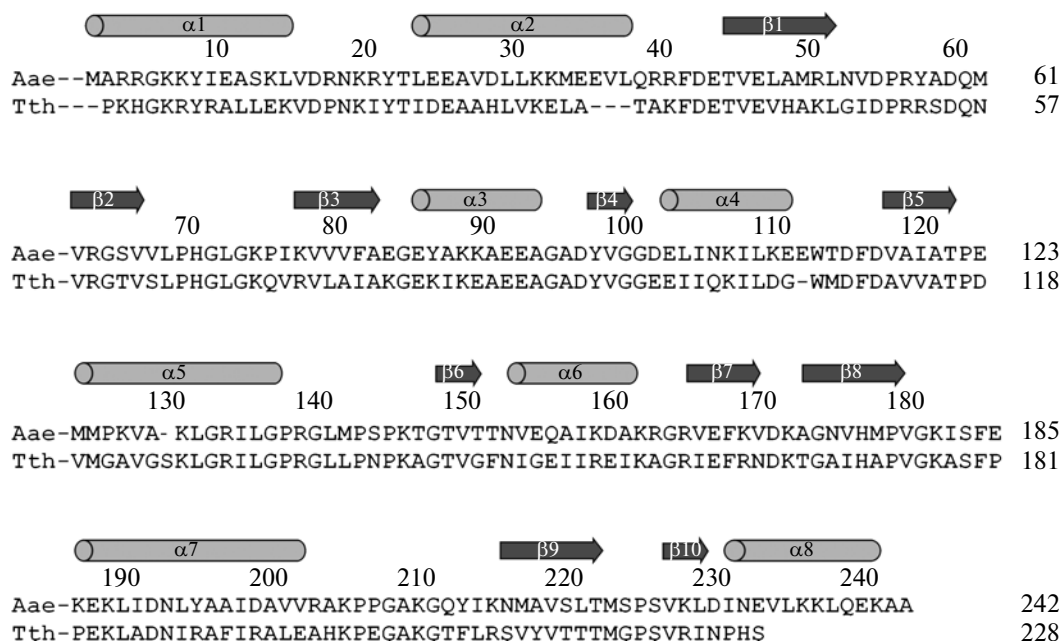


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей рибосомных белков L1 из *A. aeolicus* (AaeL1) и *T. thermophilus* (TthL1). Стрелками обозначены β -тяжи, цилиндрами α -спирали.

в предположении, что в асимметричной части ячейки находится одна молекула белка (242 аминокислотных остатка). В этом случае $V_m = 1.99 \text{ \AA}^3/\text{Да}$, содержание растворителя составляет 37.59%.

Определение пространственной структуры белка. Структура белка решена методом молекулярного замещения с использованием программы PHASER [13]. В качестве стартовой модели использована модель структуры рибосомного белка L1 из *Thermus thermophilus* (PDB ID 1AD2). Степень идентичности аминокислотных последовательностей этих белков составляет 49.6%. Вначале был проведен поиск полной модели, но результатов он не дал, были получены отрицательные значения LLG (*log-likelihood gain*). Для оптимизации поиска стартовая модель была разбита на два домена, и определение их положений проводилось последовательно. Значения LLG и Z-score (стандартное отклонение данного решения от среднего значения) после идентификации положения первого домена составили 36.3 и 8.68 соответственно. После определения позиции второго домена соответствующие величины приняли значения 109.76 и 13.11, что является показателями правильности решения. Начальная модель подверглась нескольким циклам ручной правки и кристаллографического уточнения с помощью программ COOT [14] и REFMAC [15], а окончательное уточнение проведено в программе PHENIX [16]. Статистика уточнения приведена в таблице. Карты электронной плотности были отличного качества, включая области, соответствующие концевым участкам, что позволило постро-

ить аминокислотные остатки всей полипептидной цепи.

Окончательная модель, уточненная до $R_{\text{cryst}} = 19.4$ и $R_{\text{free}} = 25.1\%$ при разрешении 2.1 \AA , содержит 242 аминокислотных остатка, 77 молекул воды, 2 иона сульфата, 1 молекулу *Tris*-HCl, 1 ацетат-ион. Полученная модель обладает хорошими стереохимическими параметрами и не содержит аминокислотных остатков, лежащих в запрещенных областях карты Рамачандрана [17, 18]. Координаты модели депонированы в банк белковых структур (Protein Data Bank, ID 3QOY).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекула белка AaeL1 содержит 242 аминокислотных остатка, что на 13 остатков больше, чем в белке TthL1, причем в основном это обусловлено удлинением C-концевой части молекулы. На рис. 1 приведено сравнение аминокислотных последовательностей двух белков и обозначение всех элементов вторичной структуры. Ленточная модель структуры белка AaeL1 приведена на рис. 2. Молекула белка AaeL1 состоит из двух доменов, структурно гомологичных соответствующим доменам белка TthL1. Первый домен содержит N- и C-концы молекулы и имеет двухслойную структуру. Один из слоев представляет собой антипараллельный β -слой, состоящий из четырех β -тяжей ($\beta 1$, $\beta 8$, $\beta 9$, $\beta 10$). Второй слой содержит две α -спирали ($\alpha 2$, $\alpha 7$). С одного торца двухслойная структура прикрыта N-концевой спиралью ($\alpha 1$), которая несколько отстоит от гло-

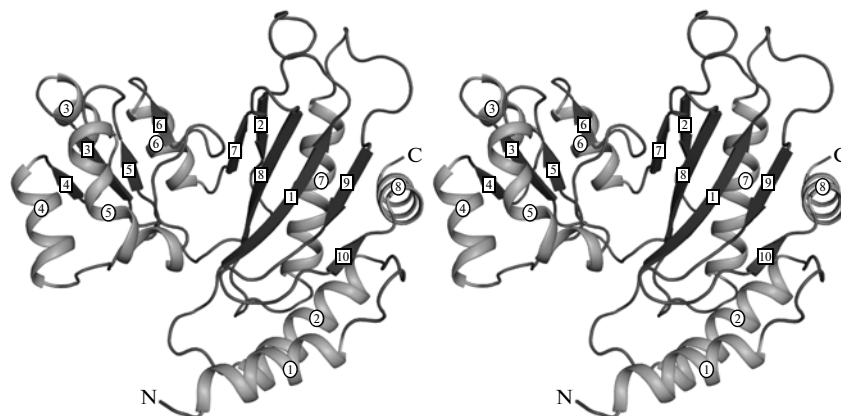


Рис. 2. Стереобразное изображение модели рибосомного белка AaeL1. Номера спиралей и тяжей указаны.

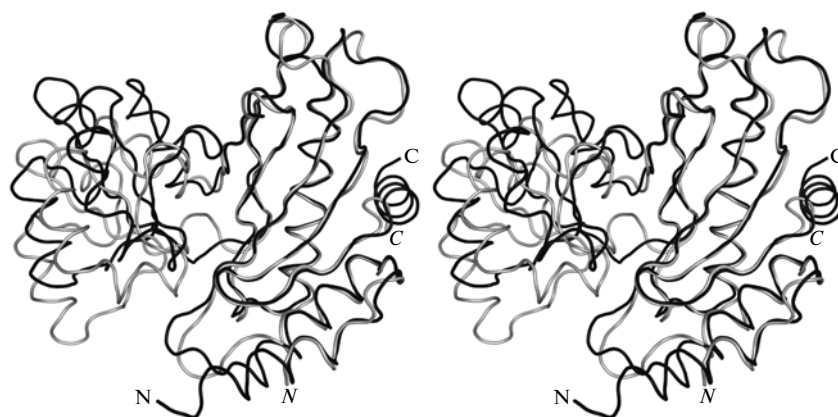


Рис. 3. Стереобразное изображение модели белка AaeL1 (черный), наложенной на структуру белка TthL1 (серый). Наложение выполнено по C_{α} -атомам β -слоя первого домена.

булярной части молекулы. Гидрофобное ядро, образованное аминокислотными остатками Val15, Leu29, Met33, Pro224, Val226, и солевой мостик между Lys7 и главной цепью (CO) Leu71 удерживают N -концевую спираль вблизи остальной части домена. С другого торца двухслойная структура прикрыта двумя антипараллельными β -тяжами ($\beta 2$, $\beta 7$). Основным отличием структур первого домена белков AaeL1 и TthL1 является наличие в AaeL1 достаточно длинной C -концевой спирали ($\alpha 8$). Кроме того, спираль $\alpha 2$ длиннее соответствующей спирали в TthL1 на три аминокислотных остатка за счет удлинения полипептидной цепи в этой области. Среднеквадратичное отклонение положений C_{α} -атомов β -слоя первого домена AaeL1 от соответствующих атомов TthL1 составляет 0.38 Å.

Второй домен имеет топологию “Росман-фолда” и содержит по две спирали с каждой стороны 4-тяжевого параллельного β -слоя. Структура β -слоя в двух белках хорошо сохраняется (r.m.s. отклонение между соответствующими C_{α} -атома-

ми составляет 0.42 Å). Однако положение α -спиралей в двух белках несколько различается. Одна из четырех спиралей ($\alpha 5$), окружающих β -слой, деформирована. В соответствующей спирали в TthL1 имеется точка излома, в результате чего она как бы состоит из двух состыкованных спиралей. В AaeL1 средняя часть $\alpha 5$ на один остаток короче, чем в TthL1, в результате этого вместо излома спираль деформируется и изгибается. Характерной особенностью структуры второго домена является наличие двух выступов, направленных в междоменную область (остатки 135-141 и 142-148). Положение второго выступа стабилизировано водородной связью с главной цепью первого домена ($\beta 7$).

Два домена соединены между собой междоменной перетяжкой, состоящей из двух противоположно направленных полипептидных цепей разной длины (остатки 70-75 и 162-164). Именно эта гибкая перетяжка позволяет доменам белка L1 менять свое взаимное положение. Белок AaeL1 имеет “закрытую” конформацию, обнаруженную ранее для TthL1 в свободном, не связанном с

РНК-состоянии. Сравнение двух структур показывает, что в L1 из *A. aeolicus* междоменный контакт более плотный, а конформация более закрытая, чем в L1 из *T. thermophilus*. Наложение структур по первому домену (рис. 3) демонстрирует большой поворот второго домена L1 *A. aeolicus* в сторону первого домена, чем это наблюдается в белке L1 из *T. thermophilus*. Прямая, проходящая через C α -атомы глицинов, принадлежащих противоположным по направлению цепям перетяжки (Gly71 и Gly163), очень близка к оси вращения доменов друг относительно друга в этих белках.

Ранее была известна структура лишь одного бактериального рибосомного белка L1 (TthL). Именно структура этого белка в свободном состоянии была до настоящего времени единственным случаем “закрытой” конформации белков L1. В комплексах TthL1 с рРНК и мРНК, необходимых для выполнения известных функций этого белка в клетке, он находится в “открытой” конформации. “Открытая” конформация характерна также для известных структур двух архейных белков L1 в свободном состоянии. Несмотря на существенные различия в аминокислотных последовательностях архейных и бактериальных белков L1, нельзя было исключить возможность того, что “закрытая” конформация TthL1 обусловлена эффектом кристаллической упаковки. Теперь оказалось, что белок L1 из другой бактерии – *A. Teolicus* – также имеет “закрытую” конформацию в свободном состоянии. Поскольку AaeL1 кристаллизуется в другой пространственной группе и его кристаллическая упаковка очень отличается от упаковки молекул в TthL1, можно полагать, что “закрытая” конформация является общей характеристикой всех бактериальных белков в свободном, не связанном с РНК, состоянии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и Программы “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zimmermann R.A. // Ribosomes, Structure, Function and Genetics / Eds. Chambliss G. et al. Baltimore: University Park Press, 1980. P. 135.
2. Gourse R.L., Sharrock R.A., Nomura M. // Structure, Function, and Genetics of Ribosomes / Eds. Hardesty B., Kramer G. New-York: Springer-Verlag, 1986. P. 766.
3. Kraft A., Lutz C., Lingenhel A. et al. // Genetics. 1999. V. 152. P. 1363.
4. Nikonov S., Nevskaya N., Eliseikina I. et al. // EMBO J. 1996. V. 15. P. 1350.
5. Nevskaya N., Tishchenko S., Volchikov S. et al. // J. Mol. Biol. 2006. V. 355. P. 747.
6. Tishchenko S., Nikonova E., Nikulun A. et al. // Acta cryst. D. 2006. V. 62. P. 1545.
7. Nevskaya N., Tishchenko S., Fedorov R. et al. // Structure. 2000. V. 8. P. 363.
8. Nevskaya N., Tishchenko S., Gabdoulkhakov A. et al. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. P. 478.
9. Nevskaya N., Tishchenko S., Paveliev M. et al. // Acta Cryst. D. 2002. V. 58. P. 1023.
10. Nikulin A., Eliseikina I., Tishchenko S. et al. // Nature Struct. Biol. 2003. V. 10. P. 104.
11. Gao Y.-G., Selmer M., Dunham C.M. et al. // Science. 2009. V. 326. P. 694.
12. Kabsch W. // XDS in International Tables for Crystallography / Eds. Rossmann M.G., Arnold E. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. V. F. Ch. 25.2.9.
13. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Storoni L.C., Read R.J. // Acta Cryst. D. 2005. V. 61. P. 458.
14. Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126.
15. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Cryst. D. 1997. V. 57. P. 240.
16. Adams P.D., Grosse-Kunstleve R.W., Hung L.-W. et al. // Acta Cryst. D. 2002. V. 58. P. 1948.
17. Laskowski R.A. // J. Mol. Graph. 1995. V. 13. P. 323.
18. Hooft R.W.W., Vriend G., Sander C., Abola E.E. // Nature. 1996. V. 381. P. 272.