

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.217.34

СВЯЗЫВАНИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S13 ЧЕЛОВЕКА С ЦЕНТРАЛЬНЫМ ДОМЕНОМ 18S рРНК

© 2011 г. А. В. Иванов, А. А. Малыгин, Г. Г. Карпова*

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090*

Поступила в редакцию 11.03.2011 г.

Принята к печати 24.03.2011 г.

Рибосомный белок S13 человека – структурный элемент малой субчастицы рибосомы – является гомологом эубактериального рибосомного белка S15, кроме того, он обладает протяженным N-концевым районом, характерным для белков семейства S15p эукариот и архей. В настоящей работе изучено связывание рекомбинантного рибосомного белка S13 и его мутантных форм, содержащих делеции или замены аминокислотных остатков в различных районах, с рНК-транскриптом, соответствующим фрагменту центрального домена 18S рРНК. Установлено, что замены ультраконсервативных остатков H101 или D108 и делеция 29 C-концевых или 27 N-концевых остатков приводят к существенному снижению сродства белка к этому рНК-транскрипту. Делеции 54 C-концевых или 80 N-концевых остатков полностью лишали белок способности к связыванию. С помощью футпринтинга определены участки в рНК-транскрипте, доступность которых для гидроксил-радикалов изменяется при связывании с полноразмерным белком S13 либо с его мутантной формой без 27 N-концевых остатков. Показано, что эти участки расположены в основном в спирали H22 18S рРНК и в области ее сочленения со спиралью H20, они соответствуют преимущественно контактам рРНК с консервативной частью белка. Сделан вывод, что связывание рибосомного белка S13 с 18S рРНК обеспечивают в основном консервативные мотивы, соответствующие мотивам его эубактериального гомолога, участвующим во взаимодействии с 16S рРНК в 30S субчастице. Роль N-концевого района белка S13 в связывании с центральным доменом 18S рРНК обсуждается.

Ключевые слова: рибосомный белок S13 человека, 18S рРНК, футпринтинг, структура 40S субчастицы рибосомы, рНК-белковые взаимодействия.

BINDING OF HUMAN RIBOSOMAL PROTEIN S13 TO THE CENTRAL DOMAIN OF 18S rRNA, by A. V. Ivanov, A. A. Malygin, G. G. Karpova* (Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Russia; *e-mail: karpova@niboch.nsc.ru). Human ribosomal protein S13 is a structural element of the small subunit of ribosome. It is a homologue of eubacterial ribosomal protein S15, and, besides, it possesses an extended N-terminal region, characteristic of the S15p family in eukaryotes and archaea. In the present study, we investigated binding of recombinant ribosomal protein S13 and its mutants containing deletions or substitutions of amino acid residues in different regions with an RNA transcript corresponding to a fragment of the central domain of 18S rRNA. We found that replacement of ultra-conservative residues H101 and D108 as well as deletions of either 29 C-terminal or 27 N-terminal residues substantially reduced affinity of the protein to the RNA transcript. Deletion of 54 C-terminal or 80 N-terminal residues completely deprived the protein of binding capacity. Using a footprinting assay, we identified sites in the RNA transcript changing their accessibilities to action of hydroxyl radicals under binding of either full-length protein S13 or its mutant lacking 27 N-terminal residues. It is shown that these sites are located mainly in helix H22 of the 18S rRNA and in the region of its junction with helix H20 and are consistent predominantly with contacts of the rRNA with the conserved part of the protein. We concluded that binding of ribosomal protein S13 to 18S rRNA is provided mainly by conserved motifs of the protein corresponding to those motifs in its eubacterial homologue that are involved in the interaction with 16S rRNA in the 30S subunit. Role of the N-terminal region of the protein in its binding to the central domain of 18S rRNA is discussed.

Keywords: human ribosomal protein S13, 18S rRNA, footprinting, structure of 40S ribosomal subunit, RNA-protein interactions.

Принятые сокращения: EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; ПААГ – полиакриламидный гель; РСА – рентгеноструктурный анализ; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; SDS – додецилсульфат натрия; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

* Эл. почта: karpova@niboch.nsc.ru

Эукариотическая рибосома — одна из самых крупных и сложно устроенных клеточных молекулярных машин [1]. Принципиальным условием функционирования этой машины является строгая упорядоченность структур ее субчастиц, большой и малой, состоящих из рибосомных РНК (рРНК) и нескольких десятков рибосомных белков [2]. Субчастицы эукариотической рибосомы морфологически подобны субчастицам рибосом эубактерий [3], но устроены более сложно. В частности, они содержат более протяженные РНК и белки, у которых нет гомологов в эубактериях, а те белки, у которых есть гомологи, имеют дополнительные районы [4].

Еще 40 лет назад было показано, что субчастицы бактериальных рибосом способны к самосборке *in vitro* из отдельных рРНК и белков, а информация о структуре субчастиц содержится в структурах их компонентов [5, 6]. С использованием подходов, основанных на самосборке субчастиц, удалось не только установить порядок сборки субчастиц (см., например [7–10]), но и картировать в них рибосомные белки. Данные, полученные с помощью этих подходов, внесли большой вклад в понимание структуры рибосомы и существенно упростили задачу расшифровки дифракционных картин кристаллов рибосомных субчастиц прокариот [11–14]. Проблема сборки *in vitro* субчастиц эукариотической рибосомы до сих пор остается нерешенной, и отчасти с этим связана скудность информации о расположении в них тех рибосомных белков и олигопептидных фрагментов, у которых нет гомологов в эубактериях. Отсутствие такой информации в свою очередь является одной из причин недостаточно высокой точности недавно опубликованных кристаллографических [15, 16] и крио-ЭМ моделей [17, 18] рибосом эукариот.

Ранее мы предположили [19], что сборку отдельных районов малой (40S) субчастицы эукариотической рибосомы можно осуществить путем поэтапного связывания рибосомных белков с отдельными фрагментами 18S рРНК, формирующими эти районы. Возможность такой сборки изучена нами на примере головы 40S субчастицы, в формировании которой принимает участие 3'-концевой домен 18S рРНК. С этой целью использовали РНК-транскрипт, соответствующий фрагменту 3'-концевого домена 18S рРНК, и рекомбинантные рибосомные белки S5, S16 и S18 человека, гомологичные белкам S7, S13 и S9 эубактерий, расположенным в голове 30S субчастицы [19–23]. Полученные данные позволили не только показать принципиальную возможность поэтапной сборки головы 40S субчастицы, но и выявить роль в сборке субчастицы тех районов рибосомных белков, у которых нет гомологии в эубактериях.

Рибосомный белок S13 человека — гомолог эубактериального белка S15, который при сборке 30S субчастицы связывается с центральным доменом

16S рРНК, формирующим район 30S субчастицы в области платформы [9]. В настоящей работе с использованием РНК-транскрипта, соответствующего фрагменту центрального домена 18S рРНК, и рекомбинантного белка S13 человека, а также его делеционных и точечных мутантов, изучено связывание белка S13 с 18S рРНК и определены структурные элементы белка, принимающие участие в этом связывании. С помощью футпринтинга установлены районы 18S рРНК, участвующие во взаимодействии с белком S13, в том числе, в связывании его N-концевого района, характерного для эукариот и архей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид (“Applichem”), ингибитор рибонуклеаз — РНКазин (“Promega”), Taq-ДНК-полимеразу (“СибЭнзим”, Новосибирск) и обратную транскриптазу AMV (“New England Biolabs”). Олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы в Лаборатории медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН). [α -³²P]GTP (1000 Ки/ммоль) и [γ -³²P]ATP (3000 Ки/ммоль) синтезированы в Биотехнологической лаборатории ИХБФМ СО РАН. РНК-полимеразы фага T7 (450000 ед. акт./мг) любезно предоставлена И. Ерегоном (Лестерский университет, Великобритания).

Получение мутантных форм рибосомного белка S13. кДНК мутантных форм белка S13 получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров (см. таблицу) и кДНК рибосомного белка S13 человека, клонированного в плазмиду pET-15b [24]. Синтезированные кДНК обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI и клонировали в плазмиду pET-15b по соответствующим сайтам рестрикции. Полученные плазмиды экспрессировали в клетках BL21(DE3) *Escherichia coli*. Синтезированные белки выделяли, очищали с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе и диализовали против 20 мМ буфера Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 100 мМ KCl [24].

Получение ДНК-матрицы для синтеза фрагмента 18S рРНК. ДНК-матрицу для фрагмента 661–683/922–1166 18S рРНК синтезировали с помощью ПЦР в два этапа. На первом этапе плазмиду pAM18T7-2, содержащую полноразмерный ген 18S рРНК человека, амплифицировали с использованием прямого праймера 18SCD-F1, 5'- и 3'-части которого соответствовали районам 668–683 и 922–938 18S рРНК, и обратного праймера 18SCD-R, комплементарного району 1144–1166 18S рРНК. Праймер 18SD-R содержал на 5'-конце тетра-нуклеотид GGGА вместо нуклеотидов, комплементарных фрагменту CGGG в положении 1152–1155 18S рРНК (см. таблицу). На втором этапе полученную

Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные для ПЦР-амплификации кДНК мутантных форм рибосомного белка S13 и ДНК-матрицы для синтеза фрагмента 18SCD

Название	Нуклеотидная последовательность
18SCD-F1	AAAAAGCTCGTAGTTGCCAGGGACGGCCGGGGGCA
18SCD-F2	GCTAATACGACTCACTATAGGGAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGCCA
18SCD-R	GGGAGAACCCAAAGACTTTGGTT
Up-pET15	AACTCAGCTTCCTTTTCG
Down-pET15	ATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCG
S13-Q62A	GTTGCAGCAGTACGTTTTG
S13-H101A	GTTTCGAAAGGCTCTTGAGA
S13-D108A	GAGAGGAACAGAAAGGCTAAGGATG
S13-Δ27N	AACTGCAGCATATGTTGACATCTGACGACGTGA
S13-Δ80N	AACTGCAGCATATGGCTCCTGATCTTCTCTGAAGA
S13-Δ29C	GGATCCTTAAATCCGGCTCTCTATTAG
S13-Δ54C	GGATCCTTAAAGCAACTGCTTTCTTAATT

ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации с прямым праймером 18SCD-F2, 5'-и 3'-части которого соответствовали промотору T7-РНК-полимеразы и району 661–683 18S рРНК, и обратный праймер 18SCD-R. Праймер 18SCD-F2 содержал остатки гуанозина вместо остатков, соответствующих U661 и C663 18S рРНК (см. таблицу). РНК-транскрипт получали с помощью T7-РНК-полимеразы как описано в [25], в качестве радиоактивного рибонуклеозидтрифосфата использовали [α - 32 P]GTP. Полученную РНК выделяли с помощью гель-электрофореза в 5%-ном денатурирующем ПААГ с последующей элюцией 0.3 М буфером NaOAc, pH 7.5, содержащим 0.05% SDS и 0.1 мМ EDTA.

Связывание 32 P-меченой РНК с рибосомными белками человека. Связывание меченого фрагмента 18SCD с белком S13 и его мутантами проводили в 50 мМ Трис-НСI-буфере, pH 7.5, содержащем 2.0 мМ MgCl₂, 300 мМ KCl и 5 мМ DTT, в течение 15 мин при 20°C; РНК предварительно выдерживали в этом же буфере в течение 10 мин при 37°C и затем охлаждали до 20°C. Концентрацию белков в реакционной смеси изменяли от 2.1 нМ до 1 мкМ, концентрация РНК составляла 5–10 пМ. Степень связывания РНК с белками определяли по сорбции комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах [26]. Сорбированную на фильтрах радиоактивность просчитывали на приборе “Molecular Imager FX Pro” (“Bio-Rad”). Кажущиеся константы ассоциации (K_a) РНК с белками определяли с помощью программы Prism 5 (GraphPad).

Гидроксил-радикальный футпринтинг. Футпринтинг комплексов 18SCD с рекомбинантными белками проводили согласно стандартному протоколу [27] с небольшими изменениями. Комплекс получали, инкубируя 1.0 пмоль 18SCD с 10 пмоль реком-

бинантного белка S13 или его мутанта в 10 мкл 50 мМ буфера HEPES-KOH, pH 7.5, содержащего 300 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0.5 мМ DTT, 2 мкг бычьего сывороточного альбумина и 5 мкг суммарной тРНК *Escherichia coli* в течение 15 мин при 20°C. Затем к этой смеси добавляли 1 мкл свежеприготовленной реакционной смеси, содержащей 12.5 мМ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 62.5 мМ аскорбиновой кислоты, 25 мМ EDTA и 0.625% H₂O₂, и инкубировали в течение 10 мин при 20°C. Реакцию останавливали, добавляя 11 мкл 1 М тиомочевины. РНК выделяли с использованием фенольной депротеинизации с последующим осаждением этанолом и анализировали с помощью обратной транскрипции [28].

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков семейства S15p. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков S13 *Homo sapiens* (UniProtKB/Swiss-Prot Acc № P62277), *Caenorhabditis elegans* (P51404), *Saccharomyces cerevisiae* (P05657), *Dictyostelium discoideum* (Q54PH8), *Arabidopsis thaliana* (P59223) и S15 *Escherichia coli* (P0ADZ4), *Thermus thermophilus* (P80378), *Bifidobacterium longum* (Q8G448), *Helicobacter pylori* (P56022), *Nostoc* sp. (Q8YU7), *Listeria innocua* (Q7ANZ1), *Aquifex aeolicus* (O66594), *Methanopyrus kandleri* (Q8TV08) и *Sulfolobus sulfataricus* (Q980A9) выполнено с помощью программы ClustalW v.2 [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ структур рибосомных белков семейства S15p и конструирование мутантных форм рибосомного белка S13 человека

Чтобы выявить структурные черты рибосомного белка S13 человека, имеющие сходство в белках семейства S15p, либо отличающие его от этих белков, мы провели множественное выравнивание

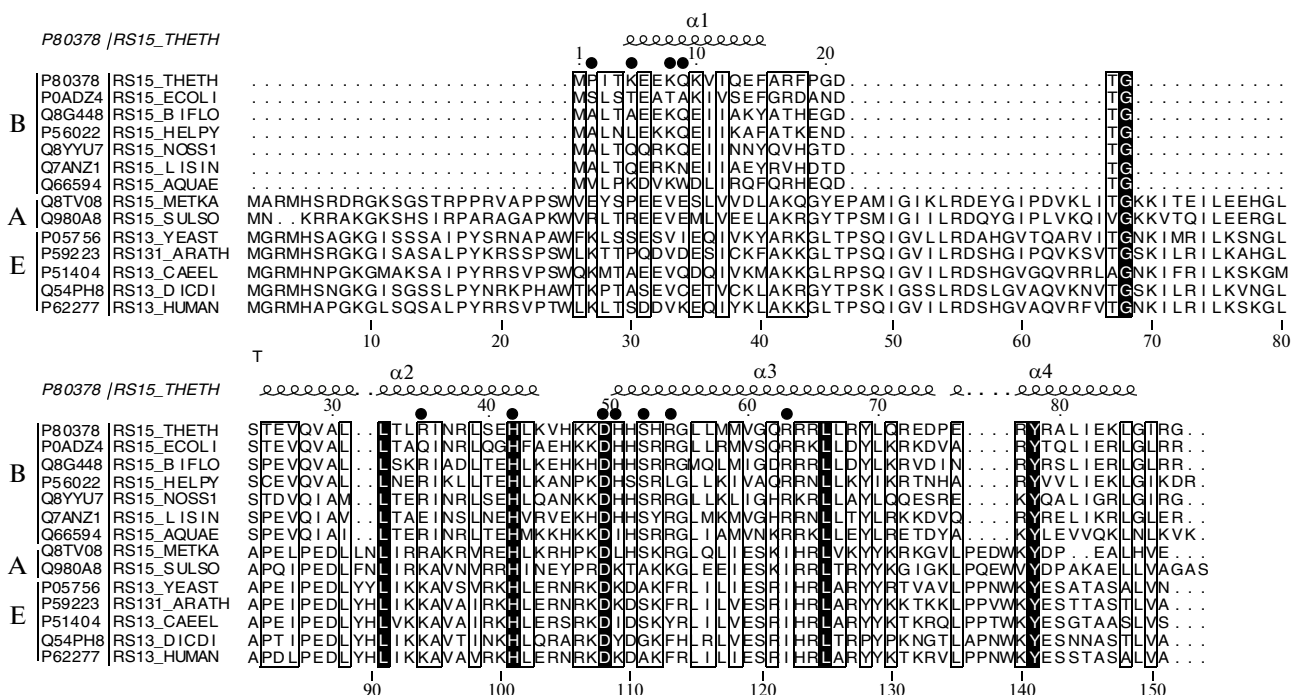


Рис. 1. Множественное выравнивание последовательностей аминокислот в рибосомных белках семейства S15p. Выбраны наиболее эволюционно удаленные представители эубактерий (B), архей (A) и эукариот (E). Консервативные аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом, инвариантные остатки помещены в черные столбцы. Сверху представлено расположение элементов вторичной структуры в рибосомном белке S15 *T. thermophilus* согласно [30]. Точками отмечены аминокислотные остатки, контактирующие с 16S рРНК в 30S рибосомной субчастице. Внизу приведена нумерация аминокислотных остатков в рибосомном белке S13 человека.

аминокислотных последовательностей белков этого семейства из различных видов эубактерий, архей и эукариот, находящихся в далеком эволюционном родстве (рис. 1). Видно, что эукариотические и архейные представители семейства S15p значительно длиннее своих эубактериальных гомологов и обладают протяженным N-концевым районом, не имеющим выраженной гомологии у эубактерий. Напротив, С-концевая часть рибосомных белков этого семейства характеризуется высокой степенью гомологии, особенно район, который в белке S15 *T. thermophilus* формирует спираль $\alpha 3$ и область ее сочленения со спиралью $\alpha 2$ [30]. В этом районе находятся инвариантные остатки H42 (нумерация аминокислотных остатков приведена для белка S15 *T. thermophilus*) и D49, которые контактируют с нуклеотидами спирали H22 16S рРНК, и консервативные положительно заряженные остатки, взаимодействующие с сахарофосфатными остовами 16S рРНК (R35, H50 и R68) и 23S рРНК (H53 и R64) [30]. В других районах гомология между эубактериальными и эукариотическими белками семейства S15p выражена слабо, поэтому вряд ли можно с уверенностью судить о соответствии между каким-либо участком в N-концевой области белка S13 и районом S15, об-

разующим спираль $\alpha 1$, которая вовлечена в связывание со спиралью H22 16S рРНК [30] (рис. 1).

Для изучения связывания рибосомного белка S13 человека с 18S рРНК был получен РНК-транскрипт (фрагмент 18SCD), соответствующий части центрального домена 18S рРНК, без шпильки H21 и эукариот-специфичного сегмента экспансии ES6. Эти районы 18S рРНК структурно обособлены от основной части центрального домена, поэтому их отсутствие не должно было влиять на формирование пространственной структуры остальной части домена, соответствовавшей фрагменту 18SCD, в котором указанные районы замещены двумя остатками цитозина. Для определения структурных детерминант белка S13, участвующих в его связывании с 18S рРНК, получен набор мутантных форм белка S13 человека. В двух мутантных формах с делециями в N-концевой части отсутствовали либо 27 (S13 Δ N27), либо 80 (S13 Δ N80) аминокислотных остатков, а в мутантных формах с делециями в С-концевой части – либо 29 (S13 Δ C29), либо 54 (S13 Δ C54) остатка. Другие мутантные формы несли точечные замены по ультраконсервативным остаткам H101 (форма S13H101A) и D108 (форма S13D108A), которые соответствуют H42 и D49 в S15 *T. thermophilus*. Наконец, в мутантной форме

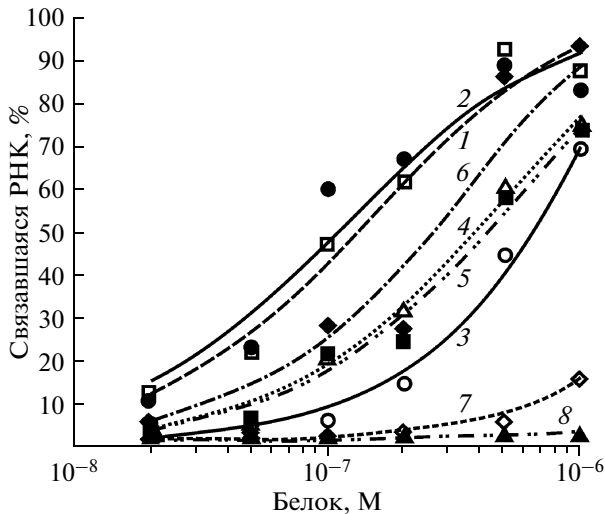


Рис. 2. Связывание рекомбинантного рибосомного белка S13 человека и его мутантных форм с фрагментом 18SCD. Представлены изотермы адсорбции полноразмерного белка S13 (1, белые квадраты), мутантов, содержащих точечные замены S13Q62A (2, черные кружки), S13H101A (3, белые кружки) и S13D108A (4, белые треугольники), и мутантов, содержащих делеции S13ΔN27 (5, черные квадраты), S13ΔC29 (6, черные ромбы), S13ΔN80 (7, белые ромбы) и S13ΔC54 (8, черные треугольники).

S13Q62A был заменен консервативный у эукариот и архей остаток Q62 в N-концевой части белка.

Связывание рекомбинантного рибосомного белка S13 и его мутантных форм с фрагментом 18SCD

Влияние мутаций в белке S13 на характер его связывания с центральным доменом 18S рРНК изучали при помощи титрования меченого фрагмента 18SCD рекомбинантным белком S13 и его мутантными формами в условиях, когда концентрация белка многократно превышала концентрацию фрагмента. Связывание регистрировали на нитроцеллюлозных фильтрах; кажущиеся константы измеряли как величину, обратную концентрации белка, при которой половина РНК-транскрипта находилась в комплексе с белком. Изотермы адсорбции представлены на рис. 2. Видно, что замена Q62A практически не влияла на характер связывания белка S13 с фрагментом 18SCD (величины K_a составляли $(10 \pm 1.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $(8.0 \pm 1.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ соответственно). Замены по ультраконсервативным остаткам H101 и D108, напротив, существенно понижали сродство белка к фрагменту 18SCD ($K_a = (1.7 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $K_a = (2.5 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ соответственно), свидетельствуя об участии этих остатков в формировании комплекса белка S13 с 18SCD. Мутантные формы S13ΔN27 и S13ΔC29 также проявляли пониженное сродство к фрагменту 18SCD по сравнению с полноразмерным белком S13 ($K_a = (2.5 \pm 0.4) \times$

10^6 M^{-1} и $K_a = (4.2 \pm 0.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ соответственно). Наконец, мутанты S13ΔN80 и S13ΔC54 практически полностью теряли способность связываться с фрагментом 18SCD.

Гидроксил-радикальный футпринтинг фрагмента 18SCD

Чтобы выяснить, какое влияние на структуру 18S рРНК оказывает связывание белка S13 и определить участок 18S РНК, с которым взаимодействует N-концевой район белка, мы зондировали гидроксил-радикалами структуру фрагмента 18SCD, изолированного и в присутствии полноразмерного белка S13 или его мутантной формы S13ΔN27. Атака гидроксил-радикалами приводит к разрывам в сахарофосфатном остове РНК, положения которых можно определить с помощью обратной транскрипции. В случае свободного фрагмента 18SCD разрывы возникали практически по всей длине цепи РНК (рис. 3а–г). Доступность всего остова 18SCD действию гидроксил-радикалов свидетельствует о том, что отрицательно заряженные спирали фрагмента практически не контактируют друг с другом. При связывании фрагмента 18SCD с полноразмерным белком S13 доступность рибозофосфатного остова в нескольких участках понижалась, что, вероятно, было вызвано экранирующим действием белка. В частности, наиболее выраженную защиту от атаки гидроксил-радикалами наблюдали в обеих цепях спирали H22 (положения 924–926, 928, 1007 и 1009–1011) и в районе ее сочленения со спиралью H20 (положения 1019, 1021, 1022 и 1024) (рис. 3д–ж). Следует отметить, что связывание фрагмента 18SCD с белком S13 не приводило к полной защите указанных положений, поскольку степень связывания фрагмента в условиях футпринтинга составляла примерно 70%.

При связывании с фрагментом 18SCD мутантной формы S13ΔN27 сахарофосфатный остов оказывался защищенным по тем же самым участкам, что и в случае полноразмерного белка S13, за исключением положений 928 и 1024 (рис. 3д–ж). Отсутствие защиты по этим положениям указывает либо на то, что мутантная форма S13ΔN27 не содержала аминокислотных остатков, контактирующих с соответствующими участками РНК, либо на изменение пространственной ориентации спиралей РНК в районе этих участков по сравнению с их ориентацией при связывании с полноразмерным белком.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что С-концевые области белков семейства S15р имеют высокую степень гомологии и содержат ряд консервативных аминокислотных остатков, которые в белке S15 *T. thermophilus* контактируют с 16S рРНК в составе 30S рибосомной субчастицы. Очевидно, в

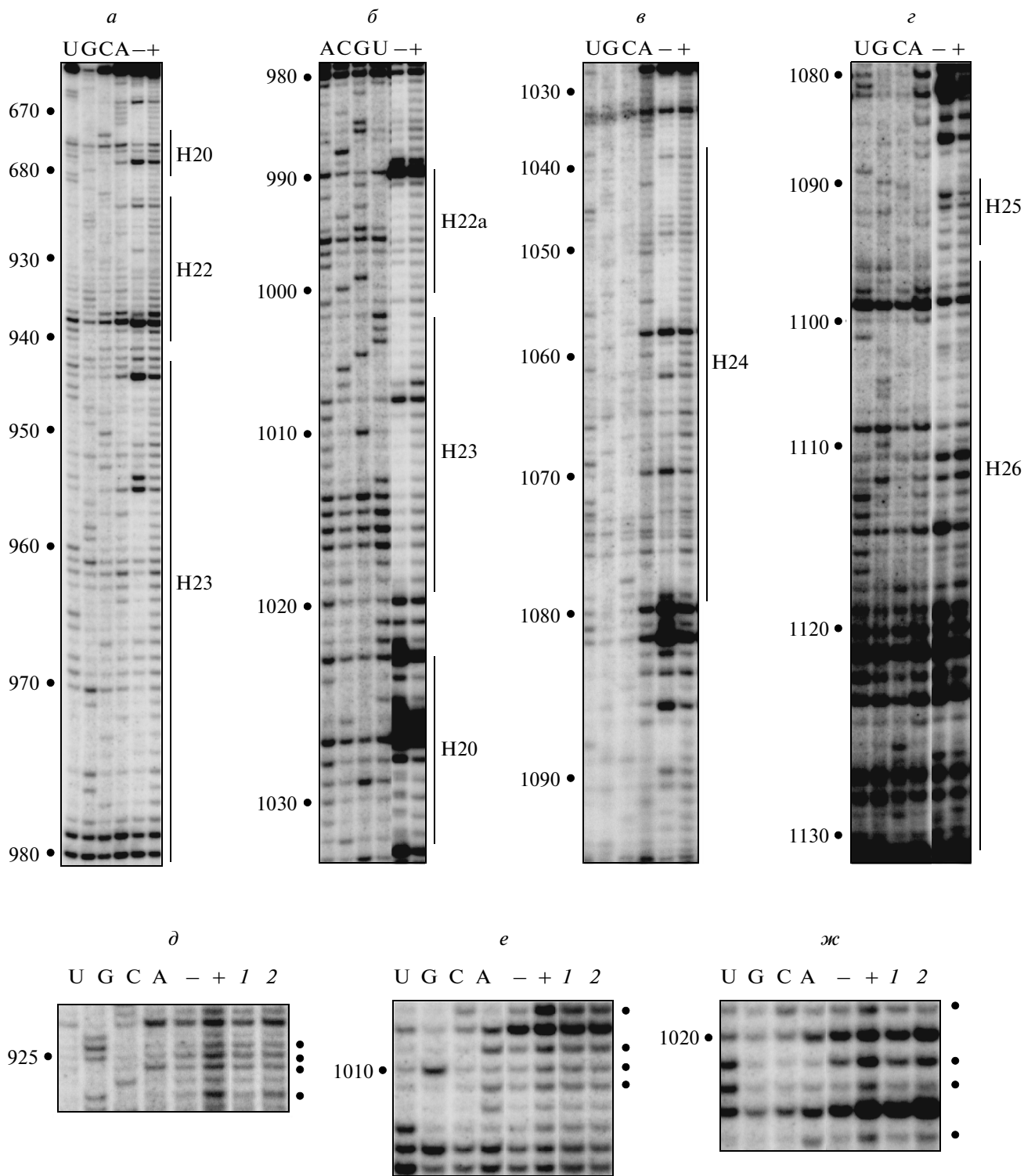


Рис. 3. Гидроксил-радикальный футпринтинг фрагмента 18SCD. Панели *a–г* – электрофоретическое разделение в ПААГ продуктов обратной транскрипции фрагмента 18SCD до (–) и после (+) его обработки гидроксил-радикалами. Дорожки А, С, G и U – определение последовательности нуклеотидов в РНК-транскрипте с использованием дидезокси-нуклеозидтрифосфатов. Слева приведена нумерация нуклеотидов в 18S рРНК, справа – положения спиралей в 18S рРНК. Панели *д–ж* – электрофоретическое разделение в ПААГ продуктов обратной транскрипции фрагмента 18SCD до (–) и после его обработки гидроксил-радикалами в присутствии рибосомного белка S13 (*1*) или его делеционного мутанта S13ΔN27 (*2*) и в отсутствие белков (+). Положения футпринтов отмечены точками.

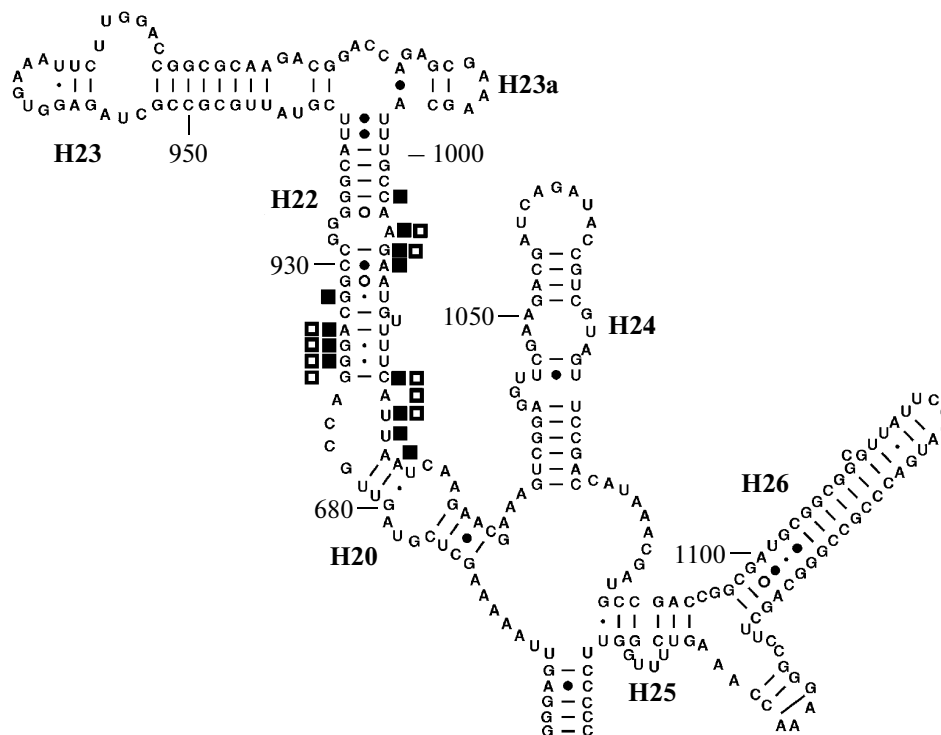


Рис. 4. Участок вторичной структуры 18S рРНК, соответствующий фрагменту 18SCD. Указаны положения гидроксил-радикальных футпринтов, специфичных для рибосомного белка S13 человека (черные квадраты), и положения, соответствующие гидроксил-радикальным футпринтам, наблюдавшимся при связывании рибосомного белка S15 *T. thermophilus* с 16S рРНК [31] (белые квадраты).

белке S13 человека большинство из этих аминокислотных остатков также вовлечено в связывание с рРНК в малой субчастице рибосомы, поскольку удаление 54 С-концевых остатков полностью лишило оставшуюся часть белка способности связываться с фрагментом 18SCD (рис. 2). В пользу этого предположения свидетельствует и то, что замена ультраконсервативных остатков H101 и D108, находящихся в С-концевой части белка S13, приводила к значительному снижению его сродства к этому фрагменту (рис. 2). С-концевой 29-звенный район белка S13 не содержит консервативных остатков, которые в белке S15 *T. thermophilus* контактируют с 16S рРНК. Тем не менее, отсутствие этого района также приводило к заметному понижению сродства оставшейся части белка S13 к фрагменту 18SCD, хотя и менее выраженному, чем в случае точечных мутаций H101A и D108A (рис. 2). Можно предположить, что этот район белка S13 либо содержит аминокислотные остатки, участвующие в связывании с 18S рРНК, либо вовлекается в поддержание пространственной структуры белка.

Интересно, что удаление 80 N-концевых остатков белка S13 имело такие же катастрофические последствия для связывания оставшейся части белка, как и удаление 54 С-концевых остатков (рис. 2), хотя эта часть и сохранила все консервативные остатки, необходимые для связывания его эубактериаль-

ного гомолога с 16S рРНК (рис. 1). Можно предположить, что N-концевая часть белка S13 имеет значение для сохранения его конформационной стабильности, что не исключает ее возможного участия в связывании с 18S рРНК и/или рибосомными белками, соседствующими с этой частью белка в 40S субчастице. Примечательно, что вклад 27-звенного N-концевого района белка S13 в связывание с 18S рРНК сопоставим с вкладом ультраконсервативного остатка D108, поскольку сродство к фрагменту 18SCD у мутантов S13ΔN27 и S13D108A практически одинаково (рис. 2). В то же время, консервативный у эукариот и архей остаток Q62 не вовлечен в связывание белка S13 с фрагментом 18SCD (рис. 2), поскольку его замена не повлияла на это связывание, что свидетельствует о возможном участии этого остатка в выполнении белком S13 каких-то других функций.

Результаты футпринтинга фрагмента 18SCD в присутствии рибосомного белка S13 человека хорошо согласуются с данными, полученными при изучении связывания белка S15 *T. thermophilus* с фрагментом центрального домена 16S рРНК [31]. Участки во фрагменте 18SCD, защищаемые белком S13 от атаки гидроксил-радикалами, и футпринты белка S15 расположены в основном в одних и тех же районах центрального домена рРНК малой субчастицы, хотя число футпринтов в случае белка S13

больше, чем у S15 (рис. 4). Это свидетельствует о консервативном характере связывания белков семейства S15p с рРНК малой субчастицы рибосомы и в то же время указывает на дополнительные контакты эукариотических представителей этого семейства.

Мы попытались соотнести полученные в настоящей работе данные с существующими крио-ЭМ-моделями рибосом эукариот [4, 32]. На этих моделях рибосомный белок S13 представлен не полностью, а только частью, гомологичной рибосомному белку S15 эубактерий. Это связано с тем, что указанные модели построены методом “докинга”, т.е. путем встраивания в полученную электронную плотность известных структур гомологичных рибосомных белков эубактерий, взятых из кристаллических структур 30S субчастицы высокого разрешения [11–14]. Сопоставляя данные футпринтинга с упомянутыми моделями [4, 32], можно видеть, что нуклеотиды в положениях 924–926, 1007, 1009–1011, 1019, 1021 и 1022 18S рРНК, защищаемые от атаки гидроксил-радикалами в присутствии полноразмерного белка S13, действительно тесно соседствуют с консервативными участками белка S13.

Недавно появились более полные модели 40S субчастиц дрожжей *S. cerevisiae* [15], инфузории *Tetrahymena thermophyla* [16] и пшеницы *Triticum aestivum* [18], построенные на основе данных РСА и крио-ЭМ, где представлены некоторые белки и олигопептидные фрагменты, которые не имеют гомологии в эубактериях (далее обозначаемые как модели 40S-Y [15], 40S-B [16] и 40S-R [18]). Однако только на одной из этих моделей (40S-B) 40S субчастицы N-концевой район рибосомного белка S13, специфичный для эукариот и архей, представлен полностью, а на двух других, 40S-Y и 40S-R, только с 35-го или 31-го аминокислотного остатка соответственно. Следует отметить, что эти модели дают довольно противоречивую информацию о пространственной структуре N-концевого района белка и его расположении на рибосоме, что, по-видимому, связано с недостаточно высоким качеством кристаллов и карт электронной плотности. Так, например, согласно модели 40S-Y N-концевая часть белка S13 содержит два α -спиральных участка, а в моделях 40S-B и 40S-R — четыре α -спиральных участка, которые различаются как по положению во вторичной структуре белка, так и по расположению в 40S субчастице. В модели 40S-B N-концевой 27-звенный фрагмент белка S13, хотя и простирается вдоль спиралей H22 и H20 18S рРНК с противоположной стороны от консервативной части белка, положения 928 (H22) и 1024 (H20), доступность которых для атаки гидроксил-радикалами существенно возросла после делеции этого фрагмента, удалены от него. В модели 40S-Y, хотя на ней и отсутствует N-концевой 34-звенный фрагмент белка S13, район 35–41, образующий α -спираль, расположен вдоль малой бороздки спирали H22 у ее основания так,

что недостающая часть белка вполне могла бы контактировать с находящимся поблизости нуклеотидом в положении 928 18S рРНК. Такое допущение нельзя сделать в случае модели 40S-R, поскольку аминокислотный остаток в положении 31 белка S13 ориентирован таким образом, что 30-звенный N-концевой фрагмент белка, будучи добавленным к этому остатку, не достиг бы спирали H22. Что касается положения 1024 в 18SCD, то, скорее всего, его защита при связывании полноразмерного белка S13 обусловлена сближением спиралей H20 и H22 под действием белка, которое приводит к экранированию этого положения от атаки гидроксил-радикалами. При делеции 27 N-концевых остатков контакт белка с 18S рРНК вблизи положения 928, по-видимому, пропадал, делая спирали H20 и H22 более подвижными, чем при связывании с полноразмерным белком, и открывая путь для атаки по положению 1024.

Таким образом, суммируя сказанное, можно заключить, что основные мотивы рибосомного белка S13, обеспечивающие его связывание с 18S рРНК, консервативны и соответствуют мотивам его эубактериального гомолога, рибосомного белка S15, формирующим контакты с 16S рРНК в малой субчастице рибосомы эубактерий. Специфичная для эукариот и архей N-концевая часть белка S13 слабо контактирует с 18S рРНК. Основная роль этой части, по-видимому, состоит в поддержании конформационной стабильности белка. Не исключено и ее возможное участие в формировании контактов с рибосомными белками, соседствующими с ней в 40S субчастице, и/или лигандами, которые связываются с рибосомой в процессе биосинтеза белка.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (11-04-00672-а, А.М.) и программой “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН (Г.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alberts B. 1998. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*. **92**, 291–294.
2. Wilson D.N., Nierhaus K.H. 2003. The ribosome through the looking glass. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 3464–3486.
3. Spahn C.M., Beckmann R., Eswar N., Penczek P.A., Sali A., Blobel G., Frank J. 2001. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*-tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*. **107**, 373–386.
4. Taylor D.J., Devkota B., Huang A.D., Topf M., Narayanan E., Sali A., Harvey S.C., Frank J. 2009. Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome. *Structure*. **17**, 1591–1604.
5. Dohme F., Nierhaus K.H. 1976. Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from *Escherichia coli* ribosomes *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **107**, 585–599.

6. Traub P., Nomura M. 1968. Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **59**, 777–784.
7. Held W.A., Nomura M. 1973. Rate determining step in the reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits. *Biochemistry*. **12**, 3273–3281.
8. Spillmann S., Dohme F., Nierhaus K.H. 1977. Assembly *in vitro* of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: proteins essential for the first heat-dependent conformational change. *J. Mol. Biol.* **115**, 513–523.
9. Talkington M.W., Siuzdak G., Williamson J.R. 2005. An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **438**, 628–632.
10. Woodson S.A. 2008. RNA folding and ribosome assembly. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 667–673.
11. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. **289**, 920–930.
12. Schlutzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*. **102**, 615–623.
13. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M.Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vonnrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **407**, 327–339.
14. Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H., Noller H.F. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. **292**, 883–896.
15. Ben-Shem A., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. 2010. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science*. **330**, 1203–1209.
16. Rabl J., Leibundgut M., Ataide S.F., Haag A., Ban N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science*. **331**, 730–736.
17. Armache J.P., Jarasch A., Anger A.M., Villa E., Becker T., Bhushan S., Jossinet F., Habeck M., Dindar G., Franckenberg S., Marquez V., Mielke T., Thomm M., Berninghausen O., Beatrix B., Soeding J., Westhof E., Wilson D.N., Beckmann R. 2010. Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 19748–19753.
18. Armache J.P., Jarasch A., Anger A.M., Villa E., Becker T., Bhushan S., Jossinet F., Habeck M., Dindar G., Franckenberg S., Marquez V., Mielke T., Thomm M., Berninghausen O., Beatrix B., Soeding J., Westhof E., Wilson D.N., Beckmann R. 2010. Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 19754–19759.
19. Malygin A.A., Yanshina D.D., Karpova G.G. 2009. Interactions of human ribosomal proteins S16 and S5 with an 18S rRNA fragment containing their binding sites. *Biochimie*. **91**, 1180–1186.
20. Яньшина Д.Д., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. 2006. Связывание рибосомного белка S5 человека с фрагментом 1203–1236/1521–1698 18S рРНК. *Молекуляр. биология*. **40**. 460–467.
21. Яньшина Д.Д., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. 2007. Связывание рибосомного белка S16 человека с фрагментом 1203–1236/1521–1698 18S рРНК. *Молекуляр. биология*. **41**. 1023–1030.
22. Яньшина Д.Д., Малыгин А.А., Карпова Г.Г. 2009. Взаимное влияние рибосомных белков S5 и S16 человека на их связывание с фрагментом 1203–1236/1521–1698 18S рРНК. *Молекуляр. биология*. **43**. 700–708.
23. Ilin A.A., Malygin A.A., Karpova G.G. 2011. Ribosomal protein S18e as a putative molecular staple for the 18S rRNA 3'-major domain core. *Biochim. Biophys. Acta*. **1814**, 505–512.
24. Malygin A.A., Parakhnevitch N.M., Karpova G.G. 2005. Human ribosomal protein S13: cloning, expression, refolding, and structural stability. *Biochim. Biophys. Acta*. **1747**, 93–97.
25. Clarke P.A. 1999. Labeling and purification of RNA synthesized by *in vitro* transcription. *Methods Mol. Biol.* **118**, 1–10.
26. Malygin A.A., Parakhnevitch N.M., Ivanov A.V., Eperon I.C., Karpova G.G. 2007. Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism. *Nucl. Acids Res.* **35**, 6414–6423.
27. Powers T., Noller H.F. 1995. Hydroxyl radical footprinting of ribosomal proteins on 16S rRNA. *RNA*. **1**, 194–209.
28. Wollenzien P.L. 1988. Isolation and identification of RNA cross-links. *Methods Enzymol.* **164**, 319–329.
29. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*. **23**, 2947–2948.
30. Brodersen D.E., Clemons W.M.Jr., Carter A.P., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. 2002. Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J. Mol. Biol.* **316**, 725–768.
31. Serganov A.A., Masquida B., Westhof E., Cachia C., Portier C., Garber M., Ehresmann B., Ehresmann C. 1996. The 16S rRNA binding site of *Thermus thermophilus* ribosomal protein S15: comparison with *Escherichia coli* S15, minimum site and structure. *RNA*. **2**, 1124–1138.
32. Chandramouli P., Topf M., Menetret J.F., Eswar N., Cannone J.J., Gutell R.R., Sali A., Akey C.W. 2008. Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution. *Structure*. **16**, 535–548.