

концентраций пиллар[5]арена коэффициенты самодиффузии выравниваются. Наиболее близки коэффициенты самодиффузии при относительной концентрации пиллар[5]арена 1 и 2. При дальнейшем увеличении концентрации коэффициент самодиффузии пиллар[5]арена начинает увеличиваться, при этом для ДНК он остается постоянным. Это свидетельствует о том, что не все молекулы пиллар[5]арена связываются с ДНК. Таким образом, можно предположить, что одна молекула палиндромного декамера ДНК может связать одну или две молекулы пиллар[5]арена.

Список литературы / References:

1. Ogoshi T., Yamagishi T., Nakamoto Y. Pillar-Shaped Macrocyclic Hosts Pillar[n]arenes: New Key Players for Supramolecular Chemistry. *Chemical Reviews*, 2016, vol. 116, pp. 7923-8002.
2. Li C., Chen S., Li J., Han K., Xu M., Hu B., Jia X. Novel neutral guest recognition and interpenetrated complex formation from pillar[5]arenes. *Chem. Commun.*, 2011, vol. 47, no. 40, pp. 11294-11296
3. Cao D., Meier H. Pillar[n]arenes – a novel, highly promising class of macrocyclic host molecules. *Asian J. Org. Chem.*, 2014, vol. 3, pp. 244-262.
4. Orts J., Bartoschek S., Griesinger C., Monecke P., Carlomagno T. An NMR-based scoring function improves the accuracy of binding pose predictions by docking by two orders of magnitude. *Journal of Biomolecular NMR*, 2012, vol. 52, pp. 23-30.
5. Yakimova L., Shurpik D., Gilmanova L., Makhmutova A., Rakhimbekova A., Stoikov I. Highly selective binding of methyl orange dye by cationic water-soluble pillar[5]arenes. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2016, vol. 14, pp. 4233-4238.
6. Khairutdinov B., Ermakova E., Sitnitsky A., Stoikov I., Zuev Y. Supramolecular complex formed by DNA oligonucleotide and thiacalix[4]arene. NMR-spectroscopy and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 2014, vol. 1074, pp. 126-133.

РОЛЬ КОНТАКТОВ N-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА БЕЛКА L27 С РИБОСОМНОЙ 23S РНК В ФОРМИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ

Фандо М.С., Коробейникова А.В.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пуццо, 142290, РФ

e-mail: fando@vega.protres.ru

Аннотация. Рибосомный белок L27 является особенностью бактериальной рибосомы. Из результатов структурных исследований известно, что вытянутый N-концевой «хвост» белка L27 достигает пептидилтрансферазного центра рибосомы, где он образует обширные контакты со спиралью H80-H81 23S рРНК, а также несколько контактов с тРНК в А- и Р-участках рибосомы. Укорочение белка L27 из *Escherichia coli* с N-конца приводит к снижению функциональной активности рибосом. Предполагается, что белок L27 играет важную роль в позиционировании тРНК в двух тРНК-связывающих сайтах рибосомы. В настоящей работе исследована роль контактов N-концевого участка белка L27 с 23S рРНК в функционировании рибосомы. С этой целью был создан ряд штаммов *E. coli*, содержащих белок L27 с точечными заменами. Оказалось, что некоторые внесенные в белок замены (K4L или K4A/K5G) приводят к значительному замедлению роста клеток и снижению активности их аппарата трансляции. На основании имеющихся структурных данных в рибосоме эти консервативные аминокислотные остатки белка L27 взаимодействуют только с 23S рРНК, но не с тРНК. Полученные в работе данные указывают на важность контактов N-концевого участка белка L27 с 23S рРНК для формирования функционально-активной бактериальной рибосомы *in vivo*.

Ключевые слова: рибосомный белок L27, рибосомная РНК, рибосома, трансляция, *Escherichia coli*.

THE ROLE OF CONTACTS OF N-TERMINAL REGION OF PROTEIN L27 WITH RIBOSOMAL 23S RNA IN THE FORMATION OF THE FUNCTIONALLY ACTIVE BACTERIAL RIBOSOMES

Fando M.S., Korobeinikova A.V.
Institute of Protein Research RAS
Institutskaya St., 4, Pushchino, 142290, Russia
e-mail: fando@vega.protres.ru

Abstract. Ribosomal protein L27 is a feature of the bacterial ribosome. Based on structural studies, the extended N-terminal tail of protein L27 is known to reach the peptidyl transferase center of the ribosome, where it forms the extensive contacts with helices H80-H81 of the 23S rRNA as well as several contacts with tRNAs at the A- and P-sites. Shortening of the *Escherichia coli* protein L27 from N-terminus led to the decrease of the functional activity of the ribosomes. It is supposed that protein L27 plays an important role in the positioning of tRNA in two tRNA-binding sites of the ribosome. In the present work, the role of the contacts of the N-terminal region of protein L27 with the 23S rRNA in the function of the ribosome has been investigated. For this purpose, a number of *E. coli* strains have been constructed containing protein L27 with the point replacements. It has turned out that some replacements (K4L or K4A/K5G) introduced into the protein lead to the significant slowdown of the cell growth and the decrease in the activity of their translation apparatus. Based on the available structural data, within the ribosome these conservative amino acid residues of protein L27 form the contacts only with 23S rRNA but not with tRNA. The data obtained in the work indicate the importance of the contacts of N-terminal region of protein L27 with the 23S rRNA for the formation of the functionally active bacterial ribosome *in vivo*.

Key words: ribosomal protein L27, ribosomal RNA, ribosome, translation, *Escherichia coli*

Введение. Рибосомный белок L27 является особенностью бактериальной рибосомы [1, 2]. Его глобулярная часть расположена в основании центрального протуберанца 50S субчастицы рибосомы, где она контактирует с нуклеотидами доменов II и V 23S рРНК [3-5]. Вытянутый N-концевой «хвост» белка L27 простирается в сторону пептидилтрансферазного центра рибосомы и может образовывать контакты с тРНК в А- и Р-участках [4, 6, 7]. Из анализа структурных данных [6, 7] следует, что в это взаимодействие могут быть вовлечены ряд аминокислотных остатков N-концевого участка белка L27, среди которых А2, Н3, G6, L7 и R11. Удаление нескольких N-концевых остатков белка L27 приводило к замедлению роста клеток *E. coli* и снижению активности их аппарата трансляции [8]. На основании этих данных предполагается, что белок L27 играет важную роль в позиционировании тРНК в двух тРНК-связывающих сайтах рибосомы. В то же время, около десятка остатков N-концевого участка белка L27 образуют множественные контакты и с 23S рРНК, а именно с нуклеотидами спирали Н80-Н81 (район связывания тРНК) [6, 7]. Мы предположили, что укорочение белка L27 может влиять не только на его прямые контакты с тРНК, но и на структуру рибосомной РНК на данном участке. В связи с этим, в настоящей работе были заменены некоторые строго консервативные аминокислотные остатки (K4, K5 или R14) белка L27, которые образуют контакты с 23S рРНК, но не с тРНК (См. рис. 1). Влияние этих изменений в белке L27 на рост клеток *E. coli* и свойства их рибосом было исследовано. Полученные данные свидетельствуют о важности некоторых контактов белка L27 с 23S рРНК для формирования активной бактериальной рибосомы *in vivo*.

Методы исследования. *Штаммы и микробиологические методы.* В работе были использованы стандартные микробиологические подходы, описанные Миллером [9]. Ростовые характеристики, а также активность аппарата трансляции клеток каждого из исследуемых штаммов оценивались по результатам 3 или 4 независимых экспериментов. Для β-галактозидазного теста клетки растили до ОП₆₀₀ = 0,2, продукцию фермента индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогактопиранозидом до 1 мМ. Накопление фермента в культуре определяли с использованием цветной реакции преобразования 2-нитрофенил-β-D-галактопиранозидом. Активность фермента была нормализована к клеточной массе.

Внесение точечных мутаций в хромосомный ген белка L27. Направленные изменения в хромосому *Escherichia coli* вносили с помощью метода «recombineering», согласно [10]. Сначала с помощью ПЦР в два этапа получали ДНК-кассету. ДНК-кассета содержала открытую рамку считывания (ОРС) гена белка L27 (*rpmA*) или его мутантной формы, спейсер из 12 пар нуклеотидов (несущий регуляторную последовательность Шайна-Дальгарно), ОРС гена бета-лактамазы (*bla*), а также короткие (~40 нуклеотидов) последовательности на 5'- и 3'-концах, гомологичные участкам, примыкающим к гену *rpmA* в хромосоме, необходимые для последующей рекомбинации. На первом этапе ОРС генов *bla* и *rpmA* (дикого типа или мутантную форму) амплифицировали независимо в двух разных ПЦР. Для амплификации ОРС гена *rpmA* дикого типа использовали праймеры 5rpmA_rec(F) и 3rpmA_5bla(R) (Таблица 1) и ДНК штамма MG1655 [11] в качестве матрицы. Для амплификации мутантной формы гена *rpmA* использовали ДНК штамма MG1655 [11] в качестве матрицы и обратный праймер 3rpmA_5bla(R) (Таблица 1), а в качестве прямого праймера использовали праймер 5rpmA(K4L)_rec(F), 5rpmA(K4A/K5G)_rec(F) или 5rpmA(R14A)_rec(F) (Таблица 1) в зависимости от вводимой мутации. Для амплификации ОРС гена *bla* использовали праймеры 3rpmA_5bla(F) и 3bla_recL27(R) (Таблица 1) и плазмиду pBAD18 [12] в качестве матрицы. На втором этапе амплифицировали полную ДНК-кассету с обратным праймером 3bla_recL27(R) и прямым праймером 5rpmA_rec(F), 5rpmA(K4L)_rec(F), 5rpmA(K4A/K5G)_rec(F) или 5rpmA(R14A)_rec(F) в зависимости от того, содержала ДНК-кассета ОРС *rpmA* дикого типа или его мутантную форму (см. табл. 1). При этом матрицей служили отжигающиеся друг на друга ПЦР-продукты, полученные на первом этапе. Полученные ДНК-касеты вставляли в хромосому клеток штамма DY330 [10]. Селекцию проводили на чашках с LB-агаром в присутствии ампициллина. Проверку и секвенирование *rpmA*-локуса полученных штаммов производили при помощи ПЦР с праймерами rpmA_check(F) и rpmA_check(R) (см.

табл. 1). После этого мутантные аллели переносили в хромосому штамма MG1655 с помощью общей трансдукции бактериофагом P1, как описано в работе Томасона с соавт. [13]. В качестве контроля во всех экспериментах был использован штамм MF01 (MG1655 *rpmA-1::bla*), содержащий аллель *rpmA-1::bla* (ОРС *rpmA* дикого типа).

Таблица 1 – Используемые в работе праймеры

Праймер	Последовательность (5'→3')
5rpmA_rec(F)	CTGGCATCAGCGCCTAAGACCTGAGGAGAGATTTCAAATGGCACATAAAAAG GCTGG
3rpmA_5bla(R)	CACGGAAATGTTGAATACTCATGATCTTCTCCACTTATTCAGCTTCGATGCT
5rpmA(K4L)_rec(F)	CTGGCATCAGCGCCTAAGACCTGAGGAGAGATTTCAAATGGCACATCTGAAG GCTGGCGGCTCCACAC
5rpmA(K4A/K5G)_rec(F)	CTGGCATCAGCGCCTAAGACCTGAGGAGAGATTTCAAATGGCACATGCGGGT GCTGGCGGCTCCACACGTAAC
5rpmA(R14A)_rec(F)	CAAATGGCACATAAAAAGGCTGGCGGCTCCACACGTAACGGTGCGGATTCAG AAGCTA AACGCC
3rpmA_5bla(F)	AGCATCGAAGCTGAATAAGTGGAGAAGATCATGAGTATTCAACATTTCCGTG
3bla_recL27(R)	GTTGCGGGGCTTTCATCCGTTACCGGGACGCGAAAACTTACCAATGCTTAAT CAGTG
rpmA_check(F)	CGTCGTCGTAAACACTATCG
rpmA_check(R)	GCGCATTTGCGGATTAACG
23S_2301	CTCCTGATGTCCGACCAG

Выделение и анализ рибосом и рибосомных субчастиц. Рибосомы из клеток контрольного и мутантных штаммов выделяли согласно опубликованным методикам [14, 15], с модификациями, описанными в работах [16, 17]. Анализ распределения рибосом и рибосомных субчастиц в образцах рибосом осуществляли центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, как описано в работах [16, 17].

Обработка рибосомных субчастиц модифицирующими реагентами и анализ модификаций в рРНК. Обработку 50S рибосомных субчастиц модифицирующими реагентами (диметилсульфатом, кетоксалем и карбодиимидом (СМСТ)) проводили в буфере 20 мМ HEPES-KOH, pH7,5, 100 мМ NH₄Cl, 10 мМ MgCl₂, 3 мМ β-МЭ согласно [18] с модификациями, описанными в работе [19]. Анализ модификаций в рибосомной РНК проводили согласно выше перечисленным работам с использованием праймера 23S_2301 (Таблица 1).

Результаты и обсуждение. В работе исследована важность межмолекулярных контактов нескольких консервативных аминокислотных остатков (K4, K5 или R14) N-концевого участка рибосомного белка L27 для формирования функционально-активной бактериальной рибосомы *in vivo*. На основании имеющихся структурных данных эти остатки белка L27 в рибосоме взаимодействуют только с 23S рРНК, но не с тРНК (См. рис. 1). Создан ряд штаммов *Escherichia coli*, содержащих белок L27 с заменой указанных остатков. Детали получения мутантных штаммов подробно описаны в главе «Материалы и методы».

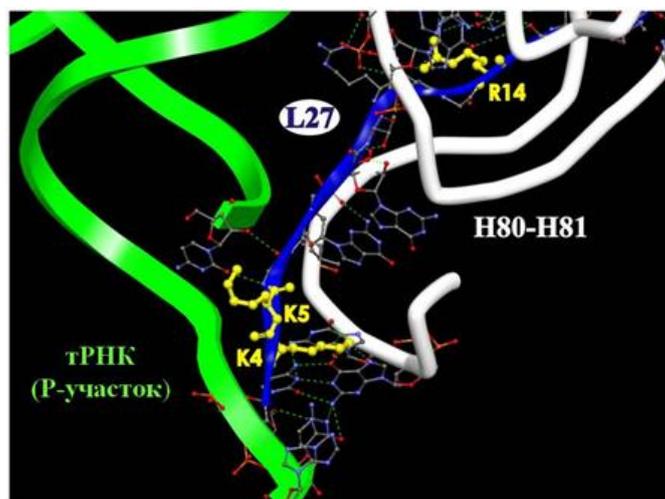


Рисунок 1 – Межмолекулярные контакты N-концевого участка белка L27 в рибосоме. Для построения модели использовали структуру бактериальной рибосомы (PDB code 4V6F). Указано положение тРНК в Р-участке, аминокислотных остатков K4, K5 и R14 N-концевого «хвоста» белка L27 и спиралей H80-H81 23S рРНК.

Одной из основных характеристик любого штамма является скорость роста, выраженная во времени удвоения клеток. Данные показатели определяли для контрольного и мутантных штаммов при температуре 37°C на богатой питательной среде LB. Как видно на См. рис. 2а, замена R14A в белке L27 практически не влияла на рост клеток *E. coli*, тогда как замена K4L или K4A/K5G в белке приводила к заметному замедлению роста клеток этой бактерии (в 1,5 и 2 раза, соответственно). Для того чтобы оценить, как внесенные в белок L27 изменения повлияли на синтез белка *in vivo*, был использован β-галактозидазный тест. Результаты этих экспериментов согласуются с данными по ростовым характеристикам клеток (См. рис. 2а и 2б). В клетках мутантного штамма, содержащего белок L27 с мутацией R14A, и в клетках контрольного штамма активность β-галактозидазы была сравнима. В то же время, в клетках, содержащих белок L27 с мутацией K4L или K4A/K5G, наблюдалось заметное снижение уровня синтеза β-галактозидазы в сравнении с контролем.

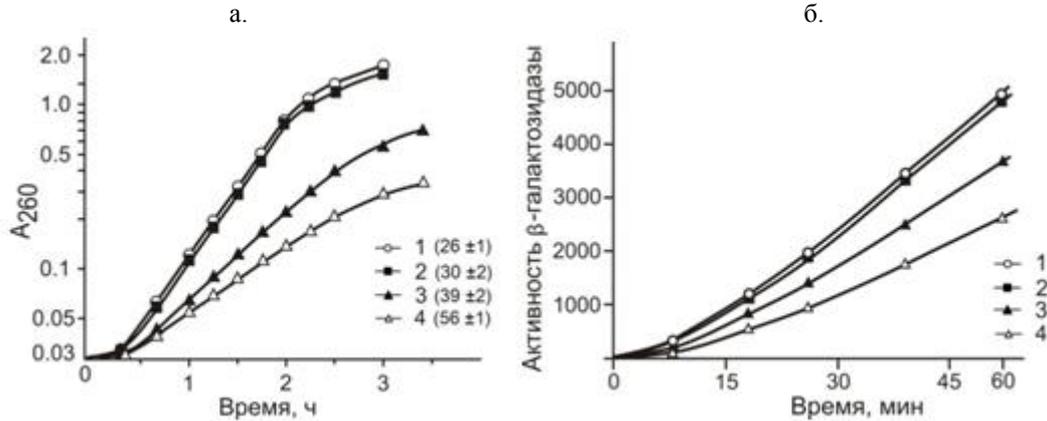


Рисунок 2 – Влияние мутаций в белке L27 на рост клеток *E. coli* и функциональные свойства их рибосом. а – Рост клеток, содержащих белок L27 дикого типа (1) или с мутацией R14A (2), K4L (3) или K4L/K5A (4). В скобках указано время удвоения клеток данного штамма, мин. б – Функциональная активность рибосом контрольного и мутантных штаммов *in vivo* (обозначения – как в секции а). Активность β-галактозидазы представлена в единицах Миллера

Рибосомы из клеток исследуемых штаммов были выделены, как описано в главе «Материалы и методы». Внесенные в белок L27 изменения не оказали заметного влияния на стабильность ассоциации рибосомных субчастиц (См. рис. 3а). Для изучения влияния мутаций в белке L27 на конформацию прилегающего к нему участка 23S рРНК был использован метод химического пробинга РНК. Как видно на См. рис. 3б, в рибосомных субчастицах, содержащих белок L27 с мутацией K4L или K4A/K5G, изменилась доступность для модифицирующих агентов нуклеотидов G2269, G2271 и U2272, расположенных в торцевой петле спирали H81 домена V 23S рРНК.

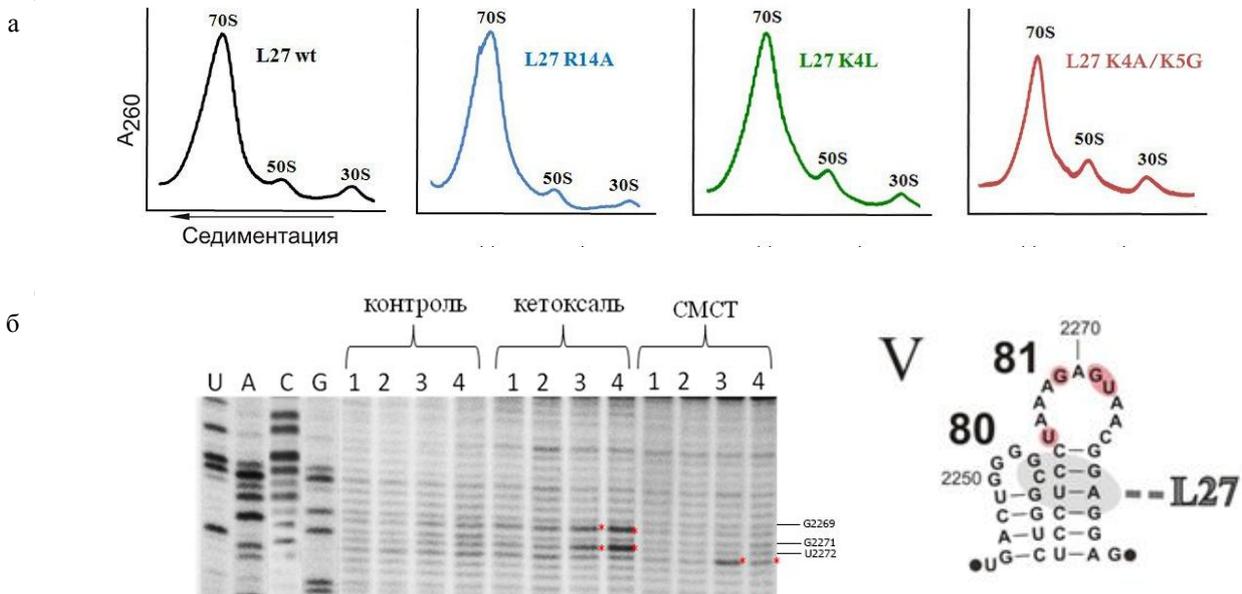


Рисунок 3 – Влияние мутаций в белке L27 на свойства рибосом *E. coli*. а – Седиментационные профили рибосом, содержащих белок L27 дикого типа или его мутантную форму. б – Результаты химического пробинга 23S рРНК контрольных и мутантных 50S субчастиц. Слева представлен фрагмент электрофореграммы анализа модификаций РНК из рибосом, содержащих белок L27 дикого типа (1) или с мутацией R14A (2), K4L (3) или K4A/K5G (4). Звездочками отмечены нуклеотиды 23S рРНК, изменившие доступность для модифицирующих агентов. Справа представлена схема участка домена V 23S рРНК. Красным цветом отмечены нуклеотиды, доступность которых изменилась в рибосомах при мутациях K4L или K4A/K5G в белке L27

Таким образом, показано, что замена R14 в белке L27 практически не влияет на рост клеток *E. coli* и активность их рибосом. В то же время, замены остатков K4 и K5 в белке L27 приводят к значительному замедлению роста клеток и снижению активности их аппарата трансляции. При этом наблюдается изменение доступности для модифицирующих агентов ряда нуклеотидов в торцевой петле спирали H81 домена V 23S рРНК (район связывания тРНК). Изменение доступности для модифицирующих агентов нуклеотидов 23S рРНК может указывать на изменение конформации рибосомной РНК в этом участке, что, по-видимому, является причиной снижения функциональной активности мутантных рибосом. Полученные результаты позволяют предположить, что контакты K4 и K5 белка L27 с 23S рРНК важны для поддержания правильной структуры участка связывания тРНК с рибосомой.

Список литературы / References:

1. Lecompte O., Ripp R., Thierry J.C., Moras D., Poch O. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res.*, 2002, vol. 30, pp. 5382-5390.
2. Ban N., Beckmann R., Cate J.H., Dinman J.D., Dragon F., Ellis S.R., Lafontaine D.L., Lindahl L., Liljas A., Lipton J.M., McAlear M.A., Moore P.B., Noller H.F., Ortega J., Panse V.G., Ramakrishnan V., Spahn C.M., Steitz T.A., Tchorzewski M., Tollervey D., Warren A.J., Williamson J.R., Wilson D., Yonath A., Yusupov M. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2014, vol. 24, pp. 165-169.
3. Harms J., Schluenzen F., Zarivach R., Bashan A., Gat S., Agmon I., Bartels H., Franceschi F., Yonath A. High Resolution Structure of the Large Ribosomal Subunit from a Mesophilic Eubacterium. *Cell*, 2001, vol. 107, pp. 679-688.
4. Selmer M., Dunham C.M., Murphy F.V. 4th, Weixlbaumer A., Petry S., Kelley A.C., Weir J.R., Ramakrishnan V. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 2006, vol. 313, pp. 1935-1942.
5. Schuwirth B.S., Borovinskaya M.A., Hau C.W., Zhang W., Vila-Sanjurjo A., Holton J.M., Cate J.H.D. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 2005, vol. 310, pp. 827-834.
6. Voorhees R.M., Weixlbaumer A., Loakes D., Kelley A.C., Ramakrishnan V. Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009, vol. 16, pp. 528-533.
7. Jenner L., Demeshkina N., Yusupova G., Yusupov M. Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, vol. 17, pp. 1072-1078.
8. Maguire B.A., Beniaminov A.D., Ramu H., Mankin A.S., Zimmermann R.A. A Protein Component at the Heart of an RNA Machine: The Importance of Protein L27 for the Function of the Bacterial Ribosome. *Mol. Cell.*, 2005, vol. 20, pp. 427-435.
9. Miller J.H. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 1972.
10. Yu D., Ellis H.M., Lee E.C., Jenkins N.A., Copeland N.G., Court D.L. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, pp. 5978-5983.
11. Blattner F.R., Plunkett G. 3rd, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, vol. 277, pp. 1453-1462.
12. Guzman L.M., Belin D., Carson M.J., Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, pp. 4121-4130.
13. Thomason L., Court D.L., Bubunenko M., Costantino N., Wilson H., Datta S., Oppenheim A. Recombineering: Genetic Engineering in Bacteria Using Homologous Recombination. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2007, ch. 1, unit 1.16, doi: 10.1002/0471142727.mb0116s78.
14. Erbe R.W., Nau M.M., Leder P. Translation and translocation of defined RNA messengers. *J. Mol. Biol.*, 1969, vol. 39, pp. 441-460.
15. Staehelin T., Maglott D.M., Monro R.E. On the catalytic center of peptidyl transfer: a part of the 50S ribosome structure. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1969, vol. 34, pp. 39-48.
16. Korepanov A.P., Gongadze G.M., Garber M.B., Court D.L., Bubunenko M.G. Importance of the 5S rRNA-binding ribosomal proteins for cell viability and translation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 366, pp. 1199-1208.
17. Korepanov A.P., Korobeinikova A.V., Shestakov S.A., Garber M.B., Gongadze G.M. Protein L5 is crucial for *in vivo* assembly of the bacterial 50S ribosomal subunit central protuberance. *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, pp. 9153-9159.
18. Moazed D., Stern S., Noller H.F. Rapid chemical probing of conformation in 16S ribosomal RNA and 30S ribosomal subunits using primer extension. *J. Mol. Biol.*, 1986, vol. 187, pp. 399-416.
19. Sergiev P.V. Molecular aspects of the functioning of ribosomal RNA. *Thesis for the degree of Doctor of Chemical Sciences*, 2008.