

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И ФИЗИКА БИОМОЛЕКУЛ

MOLECULAR BIOPHYSICS AND PHYSICS OF BIOMOLECULES

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА С УЧАСТКАМИ IRES, НАХОДЯЩИМИСЯ ЗА ПРЕДЕЛАМИ V ДОМЕНА

Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Леконцева Н.В., Черных Е.С., Немчинова М.С., Никонов О.С.
Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ
e-mail: katya_nik@vega.protres.ru

Аннотация. Ранее было показано, что основной сайт связывания глицил-тРНК синтетазы человека на IRES первого типа формируется апикальной частью его пятого домена. При этом за узнавание белком места посадки на тРНК отвечает, прежде всего, его антикодон-связывающий домен. В данной работе мы показали, что глицил-тРНК синтетаза способна взаимодействовать и с другими стержне-петлевыми участками IRES первого типа, расположенными вне пятого домена, которые, так же как и определенный ранее участок мРНК, имитируют антикодонную шпильку глициновой тРНК и содержат глициновый антикодон в петлевом участке. За специфическое взаимодействие с этими участками вирусной мРНК, по всей видимости, так же отвечает антикодон-связывающий домен глицил-тРНК синтетазы. Полученные данные подтверждают выдвинутую нами ранее гипотезу о существовании дополнительного сайта связывания гомодимера глицил-тРНК синтетазы человека на IRES первого типа.

Ключевые слова: вирусы, энтеровирус, инициация трансляции, глицил-тРНК синтетаза человека, сайт внутренней посадки рибосомы, IRES, РНК-белковые взаимодействия.

INTERACTION OF HUMAN GLYCYL-tRNA SYNTHETASE WITH IRES REGIONS LOCATED BEYOND DOMAIN V

Nikonova E.Yu., Mihaylina A.O., Lekontseva N.V., Chernykh E.S., Nemchinova M.S., Nikonov O.S.
Institute of protein research

Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia
e-mail: katya_nik@vega.protres.ru

Abstract. Previously it was shown that the primary binding site of human glycyl-tRNA synthetase on IRES type I is formed by an apical part of its fifth domain and the anticodon binding domain of human glycyl-tRNA synthetase is responsible for specificity of interactions. In this paper, we have shown that glycyl-tRNA synthetase is able to interact with the other stem-loop regions of the IRES type I located outside the fifth domain. These fragments, like the previously determined once, mimic the anticodon hairpin of glycine tRNA and contain the glycine anticodon in the loop also. Apparently, the anticodon-binding domain of glycyl-tRNA synthetase is also responsible for specific interactions with these parts of the viral mRNA. The obtained data confirm our suggestion on the existence of an additional binding site for the homodimer of human glycyl-tRNA synthetase on IRES type I.

Keywords: Viruses, enterovirus, translation initiation, human glycyl-tRNA synthetase, IRES, RNA-protein interaction.

Многие вирусы используют кэп-независимый путь инициации трансляции, при котором преинициаторный комплекс напрямую связывается со специфическим участком вирусной мРНК. У энтеровирусов и некоторых других родственных им вирусов участок посадки рибосомы представлен сайтом внутренней посадки рибосомы первого типа (IRES I) [1]. Расположен он в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) вирусной мРНК. Длина IRES I примерно 450 нт, в него входят домены 5'-НТО со второго по шестой; на 3'-конце он содержит Υn -Xm-AUG, где Υn – пиримидиновая последовательность ($n = 8-10$ н), а X -промежуток между ней и AUG триплетом ($m = 18-20$ н) [2, 3] предположительно считается местом посадки рибосомы на 5'-НТО [4]. Он отделен от старт-кодона неконсервативным промежутком, длина которого составляет от 30 нт (у риновирусов) и до 150 нт (у полиовируса). В инициации трансляции на IRES первого типа участвует целый ряд дополнительных белков ITAF (IRES trans-acting factors), список которых до сих пор полностью не определен. Одним из таких белков является глицил-тРНК синтетаза человека. Было показано, что она стимулирует инициацию трансляции полиовируса [5]. Нами ранее был определен минимальный участок связывания глицил-тРНК синтетазы человека на вирусной мРНК [6]. Это место связывания располагается в пятом домене IRES I и имитирует антикодонную шпильку глициновой тРНК, представляя собой шпильку с глициновым антикодоном в шестинуклеотидном петлевом участке.

Недавно мы показали, что глицил-тРНК синтетаза (GARS) способна связываться не только с фрагментом пятого домена IRES полиовируса, но и с соответствующими участками IRES других вирусов, что крайне важно, таксономически удаленных друг от друга. Более того, она способна связываться даже со сходными участками IRES,

которые вообще не относятся к первому типу [7]. В ходе выполнения этой работы мы нашли дополнительные стержне-петлевые участки в составе IRES первого типа, которые так же имели в составе петли глициновый антикодон. При этом, эти участки вирусной мРНК, также имитирующие антикодоновую шпильку глициновой тРНК, располагаются преимущественно в области второго и третьего доменов IRES. Мы предположили, что глицил-тРНК синтетаза, наряду с показанной ранее способностью связывать соответствующие участки пятого домена IRES из различных вирусов, окажется способна взаимодействовать и со сходными участками IRES, расположенными вне пределов его пятого домена. Ситуация, когда белок наряду с основным сайтом, узнающим соответствующий ему участок РНК, может иметь дополнительные контакты с РНК, которые не определяют специфичность связывания, не уникальна [8]. Для глицил-тРНК синтетазы, которая функционирует в качестве димера и вследствие этого имеет на своей поверхности два сайта связывания тРНК, поиск дополнительного участка на IRES тем более логически обоснован, поскольку с апикальной частью домена V способен связаться только один сайт. В данной работе мы получили ряд фрагментов мРНК вирусов, соответствующих предполагаемым дополнительным участкам взаимодействия IRES с глицил-тРНК синтетазой человека. Для экспериментальной проверки выдвинутой нами гипотезы мы использовали фрагменты мРНК вируса коксаки CVB3 (*Энтеровирус В*) (нуклеотиды 119-157), содержащий глициновый антикодон ACC в шестинуклеотидной петле, вируса обезьян SA5 (*Энтеровирус В*) (нуклеотиды 289-315), содержащий глициновый антикодон CCC в семинуклеотидной петле, и энтеровируса бабуина BA13 (*Энтеровирус А*) (нуклеотиды 128-163), содержащий глициновый антикодон UCC в пятинуклеотидной петле (рис 1). Нуклеотидные последовательности мРНК энтеровирусов, содержащие предполагаемые участки связывания GARS были клонированы в вектор pUC18. Для ПЦР мы использовали перекрывающиеся олигонуклеотиды-праймеры, один из которых содержал сайт для эндонуклеазы рестрикции HindIII и последовательность T7-промотора, а второй – сайт для эндонуклеазы рестрикции SmaI. Нуклеотидные последовательности полученных конструкций были проверены секвенированием.

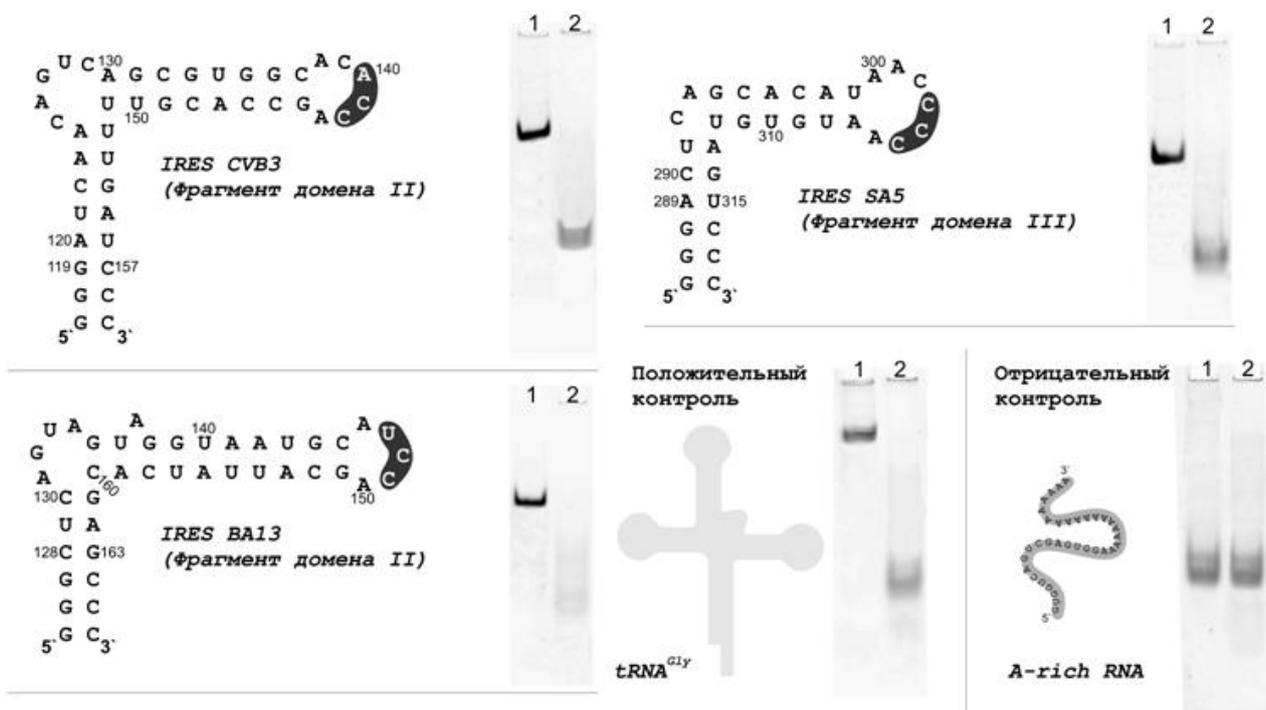


Рисунок 1 – Вторичные структуры фрагментов вирусных мРНК и электрофоретический анализ связывания этих фрагментов с глицил-тРНК синтетазой человека в неденатурирующих условиях (дорожка №1 – РНК, дорожка №2 РНК+белок). Глициновая тРНК использована в качестве положительного контроля. В качестве отрицательного контроля использована поли(А)-богатая РНК (A-rich RNA), с которой специфически взаимодействуют бактериальные белки HFQ [9]

Фрагменты мРНК были получены с линеаризованных плазмид транскрипцией *in vitro* с помощью T7 РНК полимеразы. Анализ и очистку РНК транскрипта проводили с помощью электрофореза в 10% ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Дальнейшую очистку РНК проводили с помощью элюции из геля и анионообменной хроматографии на смоле DEAE-Sepharose.

Взаимодействие глицил-тРНК синтетазы человека с полученными фрагментами IRES было исследовано методом гель-шифта. К раствору фрагмента РНК добавляли $MgCl_2$ до конечной концентрации 10 мМ, прогревали в течение 10 мин при $60^{\circ}C$, после чего охлаждали во льду. Затем добавляли глицил-тРНК синтетазу (белок был в буфере 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ $MgCl_2$, 175 мМ NaCl) в молярном соотношении с РНК 1:1. Полученный раствор выдерживали в течение часа при комнатной температуре. Для анализа изменения подвижности РНК-белковых комплексов в геле проводили электрофорез в 10% ПААГ, который окрашивали красителем SYBR® Green I (см. рис. 1).

Были проведены эксперименты по связыванию данных фрагментов с глицил-тРНК синтетазой человека. Полученные результаты подтверждают высказанную нами ранее гипотезу о возможности существования дополнительных мест взаимодействия IRES и глицил-тРНК синтетазы. На рисунке 2 хорошо видно, что во всех исследованных случаях происходит формирование РНК-белкового комплекса. Количественную оценку сродства глицил-тРНК синтетазы к каждому из использованных фрагментов мы планируем дать позже, используя метод поверхностного резонанса плазмонов. Но уже сейчас видно, что наблюдается полный переход использованных нами фрагментов вирусных РНК в РНК-белковый комплекс. В качестве положительного контроля мы использовали основной клеточный субстрат глицил-тРНК синтетазы человека - тРНК^{Gly}, с которой мы так же видим образование комплекса, о чем свидетельствует изменение подвижности образца в геле. В качестве отрицательного контроля нами была взята одноцепочечная поли(А)-богатая РНК (A-rich RNA), с которой специфически взаимодействуют бактериальные белки HFQ (9). Эти данные так же косвенно подтверждают выдвинутую нами ранее гипотезу о том, что с вирусным IRES связывается функционально активная димерная форма глицил-тРНК синтетазы человека, при этом второе место связывания, как и первое, основное, узнается её антикодон-связывающим доменом. По-видимому, сродство белка к дополнительному месту на IRES ниже, чем в случае специфического связывания, что может определяться различным окружением антикодона в том и другом случаях. Поэтому дополнительный сайт, не являясь принципиально важным для посадки глицил-тРНК на IRES, может быть необходим для её правильного позиционирования и последующей корректной ориентации 48S комплекса (5).

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-14-00028.

Список литературы / References:

1. Sweeney T.R., Abaeva I.S., Pestova T.V., Hellen, C.U.T. The mechanism of translation initiation of type 1 picornavirus IRESs. *The EMBO J.*, 2014, vol. 33, pp. 76-92.
2. Jang S.K., Pestova, T.V., Hellen C.U.T., Witherell G.W., Wimmer, E. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme*, 1990, vol. 44, pp. 292-309.
3. Pestova T.V., Hellen C.U., Wimmer E. Translation of poliovirus RNA: role of an essential cis-acting oligopyrimidine element within the 5' nontranslated region and involvement of a cellular 57-kilodalton protein. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, pp. 6194-6204.
4. Pestova T.V., Hellen C.U. and Wimmer E. A conserved AUG triplet in the 5' nontranslated region of poliovirus can function as an initiation codon in vitro and in vivo. *Virology*, 1994, vol. 204, pp. 729-737.
5. Andreev D.E., Hirnet J., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Niepmann M., Shatsky I.N. Glycyl-tRNA synthetase specifically binds to the poliovirus IRES to activate translation initiation. *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. 12, pp. 5602-14.
6. Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Леконцева Н.В., Никонов О.С., Кляшторный В.Г., Кравченко О.В., Андреев Д.Е., Шатский И.Н., Гарбер М.Б. Определение минимального фрагмента полиовирусного ires-элемента, необходимого для образования специфического комплекса с человеческой глицил-тРНК синтетазой. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 2, с. 277-85. [Nikonova E.Y., Mihaylina A.O., Lekontseva N.V., Nikonov O.S., Klyashtorny V.G., Kravchenko O.V., Andreev D.E., Shatsky I.N., Garber M.B. Determination of the Minimal Fragment of the Poliovirus IRES Necessary for the Formation of a Specific Complex with the Human Glycyl-tRNA Synthetase. *Biofizika.*, 2016, vol. 61, no. 2, pp. pp. 277-85 (In Russ.)]
7. Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Немчинова М.С., Гарбер М.Б., Никонов О.С. Глицил-тРНК синтетаза – возможный универсальный регулятор инициации трансляции на IRES первого типа. *Молекулярная биология*, 2018 (в печати) [Nikonova E.Y., Mihaylina A.O., Nemchinova M.S., Garber M.B., Nikonov O.S. Glycyl-tRNA synthetase is the universal regulator of the translation initiation at the IRES-I. *Molecular biology*, 2018 (in press) (In Russ.)].
8. Brodersen D.E., Clemons W.M., Carter A.P., Wimberly B.T. and Ramakrishnan V. Crystal structure of 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 316, pp. 725-768.
9. Nikulin A., Mikhailina A., Lekontseva N., Balobanov V., Nikonova E., Tishchenko S. Characterization of RNA-binding properties of the archaeal Hfq-like protein from *Methanococcus jannaschii*. *J Biomol Struct Dyn.*, 2017, vol. 35, no. 8, pp. 1615-1628.