

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.217.56;537.635

ИНТЕРФЕЙС ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДОМЕНА ФАКТОРА ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eRF1 ЧЕЛОВЕКА С РИБОСОМАМИ ЭУКАРИОТ

© 2008 г. Е. В. Иванова¹, Е. З. Алкалаева^{1,2}, Б. Бирдсал³, П. М. Колосов¹,
В. И. Польшаков^{4*}, Л. Л. Киселев¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Университет Осло, Центр Медицинских исследований, Москва, 119991

³Molecular Structure Division, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, NW71AA UK

⁴Центр магнитной томографии и спектроскопии
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

Поступила в редакцию 18.06.2008 г.

Принята к печати 01.07.2008 г.

Остановка биосинтеза белка в клетках эукариот определяется взаимодействием факторов терминирования трансляции 1- и 2-го классов с рибосомой. Средний (М) домен фактора терминирования трансляции 1-го класса – eRF1 – содержит строго консервативный трипептид GGQ и участвует в гидролизе сложноэфирной связи пептидил-тРНК в пептидилтрансферазном центре большой субъединицы рибосомы эукариот. Методы гетероядерной спектроскопии ЯМР были использованы для определения интерфейса взаимодействия М-домена eRF1 человека с рибосомами эукариот. Установлено, что белок связывается специфически с большой 60S субъединицей рибосомы: аналогичного взаимодействия с малой 40S не обнаружено. Аминокислотные остатки белка, формирующие интерфейс взаимодействия с рибосомой, расположены преимущественно вдоль длинной α -спирали $\alpha 1$ М-домена. Кроме того, ряд аминокислотных остатков, соседствующих с $\alpha 1$ и расположенных в β -листовом тяжё $\beta 5$ и в двух коротких α -спиралях $\alpha 2$ и $\alpha 3$, также вовлечены в формирование контакта белок-рибосома. Взаимодействие функционально неактивного мутанта G183A с 60S рибосомой оказалось существенно более слабым по сравнению с белком дикого типа. Кроме того, интерфейс взаимодействия не идентичен в этих двух случаях. Полученные результаты свидетельствуют о функциональной важности длинной спирали $\alpha 1$ М-домена и указывают на то, что конформационная подвижность GGQ петли важна для образования плотного контакта белок-рибосома.

Ключевые слова: рибосома эукариот, средний домен eRF1, терминирование трансляции, спектроскопия ЯМР, взаимодействие белок-рибосома.

INTERFACE OF THE INTERACTION OF THE MIDDLE DOMAIN OF HUMAN TRANSLATION TERMINATION FACTOR eRF1 WITH EUKARYOTIC RIBOSOMES, by E. V. Ivanova¹, E. Z. Alkalaeva^{1,2}, B. Birdsall³, P. M. Kolosov¹, V. I. Polshakov^{4*}, L. L. Kisselev¹, (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ²University of Oslo, Medical Research Center, Moscow, 119991 Russia; ³Molecular Structure Division, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, NW71AA UK; ⁴Center for Magnetic Tomography and Spectroscopy, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: vpolsha@mail.ru). Termination of translation in eukaryotes is governed by two polypeptide chain release factors. The middle (M) domain of the class 1 translation termination factor eRF1 contains the strictly conserved GGQ motif and involved in hydrolysis of the peptidyl-tRNA ester bond within the peptidyl transferase center of the large ribosome subunit. Heteronuclear NMR spectroscopy was used to map the interaction interface of the M-domain of human termination factor eRF1 with eukaryotic ribosomes. The protein was found to interact specifically with the large 60S ribosomal subunit: no interaction was detected between the M-domain of eRF1 and the 40S ribosomal subunit. The protein residues at the interaction interface are mainly situated on the long

Принятые сокращения: eRF1 – эукариотический фактор терминирования трансляции 1-го класса; HSQC – гетероядерная корреляционная спектроскопия с одноквантовым переносом когерентности; Ni-NTA – нитрилтриацетат никеля; RF1 и RF2 – бактериальные факторы терминирования трансляции 1-го класса; а.о. – аминокислотный остаток; ДТТ – 1,4-дителиотреитол; ИПТГ – изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид.

* Эл. почта: vpolsha@mail.ru

α -helix, $\alpha 1$ of the M-domain. Some residues adjacent to $\alpha 1$, in strand $\beta 5$, and in two short helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$ are also involved in the protein-ribosome contact. The interaction of the functionally inactive mutant G183A with the 60S ribosomal subunit is substantially weaker than that found for the wild-type protein. Moreover, the interaction interfaces are not identical in these two cases. The results highlight the functional importance of the long $\alpha 1$ helix and also indicate that conformational flexibility of the GGQ loop is essential for forming tight protein-ribosome contacts.

Key words: eukaryotic ribosome, middle domain of eRF1, termination of translation, NMR spectroscopy, protein-ribosome interaction.

Фактор терминации трансляции эукариот eRF1 отвечает за узнавание стоп-кодона, который находится в конце кодирующей нуклеотидной последовательности мРНК, и за следующий за этим событием гидролиз пептидил-тРНК [1]. С помощью рентгеноструктурного анализа установлено, что молекула eRF1 состоит из трех доменов: N-концевого (N-домен), среднего (М-домен) и С-концевого (С-домен) [2]. Основной функцией N-домена является узнавание стоп-кодона в декодирующем центре малой рибосомной субчастицы [3–6]. С-домен взаимодействует с фактором терминации второго класса eRF3 [7–9], который представляет собой рибосомо- и eRF1-зависимую GTPазу, стимулирующую активность eRF1 [10]. Ключевая функция М-домена – участие в гидролизе связи пептидил-тРНК [11]. М-домен содержит инвариантный трипептидный фрагмент Gly-Gly-Gln, или так называемый GGQ-мотив (позиции 183–185 в eRF1 человека), который является общим для всех факторов терминации трансляции, включая RF1 и RF2 прокариот и митохондрий, eRF1 эукариот и aRF1 архебактерий [2, 11, 12]. По данным рентгеноструктурного анализа [13], а также криоэлектронной микроскопии [14, 15] в рибосоме *Escherichia coli* GGQ-мотив находится в пептидил-трансферазном центре большой субъединицы. Любые замены каждого из глицинов в составе трипептида GGQ приводят к полной потере способности eRF1 вызывать гидролиз связи пептидил-тРНК *in vitro* и *in vivo* как у эукариот, так и у прокариот [2, 11, 16, 17]. Так, GAQ-мутанты RF1 и RF2 в 4–5 раз менее эффективны в терминационной реакции, чем соответствующие факторы дикого типа, однако данная мутация не влияет на связывание факторов с рибосомой [18]. Совокупность структурных и биохимических данных свидетельствует о том, что мини-домен GGQ и у прокариот, и у эукариот выполняет универсальную функцию – индуцирует гидролиз пептидил-тРНК в пептидил-трансферазном центре.

RF-активность *in vitro* сохраняется и в отсутствие С-домена, т. е. при использовании NM-домена вместо целого eRF1 [19]. Эти данные свидетельствуют о том, что С-домен eRF1 не вносит существенного вклада в связывание белка с рибосомой. В то же время, способность фактора eRF1 индуцировать GTPазную активность eRF3 *in vitro* сохраняется при удалении N-домена [20]. Стимуляция GTPазной ак-

тивности eRF3 возможна только при образовании тройного комплекса eRF3•eRF1•рибосома [10, 21], т. е. МС-фрагмент eRF1 способен эффективно связываться с рибосомой. Таким образом, совокупность данных позволяет предполагать, что М-домен eRF1 способен связываться с большой субчастицей рибосомы.

Ранее структура и динамические свойства изолированного М-домена eRF1 в растворе были исследованы с помощью спектроскопии ЯМР [22]. Метод ЯМР предоставляет уникальную возможность и для мониторинга межмолекулярных взаимодействий, включая взаимодействие белков с рибосомой или ее субчастицами. Так, методом ЯМР установлено, что бактериальный (*E. coli*) фактор инициации трансляции IF3 взаимодействует с 30S субъединицей рибосомы. При добавлении 30S субъединицы рибосом в молярном соотношении от 1 до 5% к белку IF3 наблюдали селективное уширение некоторых сигналов в 1D-спектре ЯМР белка [23]. Позже другие исследователи использовали эти наблюдения для определения интерфейса взаимодействия факторов инициации трансляции IF1 [24] и IF3 [25] с теми же 30S субъединицами рибосомы *E. coli*. В этих работах использовали белки, меченные изотопом ^{15}N , и методы гетероядерной корреляционной спектроскопии для определения аминокислотных остатков, сигналы которых оказывались наиболее чувствительными к добавлению субчастиц рибосом. Авторам удалось выявить такие аминокислотные остатки по изменению интенсивности их сигналов в спектрах ^{15}N - ^1H HSQC в процессе титрования белка 30S субъединицами рибосомы. Показано, что именно эти идентифицированные в спектрах HSQC а.о. IF1 и IF3 формируют центры взаимодействия исследуемых белков с рибосомой.

Цель нашего исследования – определить, способен ли изолированный М-домен eRF1 человека специфично связываться с 60S субчастицей рибосомы, а также определить аминокислотные остатки, формирующие интерфейс взаимодействия белка с рибосомой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение изолированного М-домена eRF1 человека, меченного ^{15}N . Для биосинтеза М-домена eRF1 человека клетки *E. coli* трансформировали ре-

комбинантной плазмидой, полученной на основе вектора pET23b(+) ("Novagen", США), кодирующей eRF1 с 140-го по 275-й а.о. [20]. Суперэкспрессию гена белка М-домена проводили в клетках *E. coli*, штамм BL 21(DE3). Синтезируемый рекомбинантный М-домен содержал на С-конце His₆ в соответствии с конструкцией вектора.

Для получения М-домена eRF1 человека, меченого стабильным изотопом ¹⁵N, клетки *E. coli* выращивали на минимальной среде М9, в которой в качестве единственного источника азота был использован ¹⁵NH₄Cl. Для приготовления 1 л минимальной среды М9 растворяли 6 г Na₂HPO₄, 3 г KH₂PO₄, 0.5 г NaCl и 1 г ¹⁵NH₄Cl, доводили pH до 7.4 и автоклавируют. Клетки *E. coli* выращивали в среде М9 при 37°C до плотности A₆₀₀ = 0.8–1.0, далее добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.8 мМ и инкубировали 16–20 ч при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием и лизировали ультразвуком. М-домен eRF1 выделяли с помощью метода аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе ("Qiagen", США), аналогично тому, как это описано ранее для выделения целого белка eRF1 [19]. Далее М-домен eRF1 очищали с помощью ионообменной хроматографии, используя систему АКТА ("GE Healthcare", Великобритания) и колонку HiTrap HP SP объемом 1 мл. Раствор белка в 20 мМ калий-фосфатном буфере (pH 6.9), содержащем 5 мМ β-меркаптоэтанол и 50 мМ NaCl, наносили на колонку, белок элюировали линейным градиентом NaCl от 50 мМ до 1 М. Очищенный таким образом М-домен eRF1 человека диализовали против буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl (pH 6.5), 50 мМ NaCl, 2.5 мМ MgCl₂.

Выделение и очистка 60S и 40S субъединиц рибосом. 80S рибосомы получали из ретикулоцитов кролика. Лизат ретикулоцитов центрифугировали при 245000 g 4.5 ч при 6°C. Осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 30 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 50 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 2 мМ DTT, 0.25 М сахарозу. В ресуспендированный осадок по каплям добавляли 4 М KCl до концентрации 0.5 М и затем центрифугировали при 245000 g в течение 4.5 ч. Осадок ресуспендировали в следующем буфере: 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 50 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 2 мМ DTT. Далее вносили пуромидин до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали 10 мин во льду и 10 мин при 37°C. Добавляли по каплям 4М KCl до конечной концентрации 0.5 М и центрифугировали в градиенте сахарозы 10–30% при 112500 g в течение 13 ч. Градиент сахарозы фракционировали, измеряли оптическую плотность и объединяли фракции с максимальным содержанием материала. Субчастицы рибосом переводили в буфер, содержащий 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 2.5 мМ MgCl₂, 2 мМ DTT, 0.1 мМ EDTA, 50 мМ KCl, 0.25 М сахарозу и центрифугировали при 245000 g в течение 7 ч. Осадок субчастиц рибосом растворяли в том же буфере и доводили до нужной концентрации (не менее 100 опт.ед./мл для 60S и не менее 70 опт.ед./мл для 40S).

Эксперименты ЯМР выполняли на спектрометрах Varian Inova 600 и 800 МГц и Bruker Avance 600 МГц, оборудованных криодатчиками тройного резонанса для регистрации резонанса ядер ¹H и возбуждения ядер ¹⁵N и ¹³C. Образцы М-домена eRF1 в диапазоне концентраций от 30 до 200 мкМ и объемом 600 мкл использовали для титрования 40S и 60S субъединиц рибосом. Титрование (прямое и обратное) проводили при молярных соотношениях 60S субъединицы рибосом и М-домена eRF1 равных 1 : 15000, 1 : 9000, 1 : 8000, 1 : 7500, 1 : 5000, 1 : 4500, 1 : 4250, 1 : 4000, 1 : 3500, 1 : 2500 и 1 : 2000. В качестве контроля на специфичность взаимодействия М-домен титровали 40S субъединицами рибосомы, которые добавляли в молярных соотношениях 40S/М-домен, равных 1 : 3500 и 1 : 1750. Влияние ионной силы раствора на взаимодействие М-домена с 60S субъединицами оценивали, постепенно увеличивая концентрацию NaCl в конечной смеси от 50 мМ до 75 мМ. Исследовали также взаимодействие мутантной формы G183A М-домена белка eRF1 человека с 60S субъединицами рибосомы, для чего измеряли спектры ЯМР растворов рибосомы и белка в соотношении 1 : 8000, 1 : 5000, 1 : 4000, 1 : 3000 и 1 : 1500.

Все спектральные измерения проводили при температурах 298 и 278К. Для мониторинга изменения ширины резонансных линий использовали спектры ¹⁵N-¹H HSQC [26], измеренные при температуре 278К.

Анализ спектров ЯМР и визуализация результатов. Преобразование спектров ЯМР осуществляли с помощью программного пакета nmrPipe [27]. В процессе преобразования использовали гауссовую взвешивающую функцию по осям ¹H и ¹⁵N. После Фурье-преобразования по двум измерениям размер матрицы 2D спектра составлял 2048x1024. Для визуализации, анализа спектров и интегрирования сигналов ЯМР использовали программы nmrDraw [27] и Sparky (<http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky>)

Для измерения интегральной интенсивности сигналов определяли параметры гауссовой формы линии разрешенных сигналов в спектрах HSQC методом нелинейной регрессии с использованием стандартных алгоритмов программы Sparky. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР как дикой формы М-домена eRF1 человека, так и мутанта G183A основано на результатах, опубликованных ранее [22, 28].

Для визуализации полученных результатов использовали программы молекулярной графики InsightII (Accelrys, США) и VMD [29]. Для расчета молекулярной поверхности белка, доступной для растворителя, использовали программу InsightII и алгоритм Конноли [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мониторинг взаимодействия М-домена eRF1 с 60S субъединицей рибосомы показал, что при мо-

лярном соотношении белка и рибосомы более 5000 : 1 видимых изменений в интенсивности и ширине сигналов белка в спектрах HSQC не наблюдается. При последующем увеличении концентрации 60S субъединиц интенсивность сигналов белка уменьшается, и степень такого уменьшения соответствует изменению молярного соотношения белок/рибосома в растворе. При молярных соотношениях белка и рибосомы менее 3000 : 1 наблюдается практически полное уширение всех сигналов и их фактическое исчезновение из спектров HSQC. Наиболее значимые изменения в спектрах происходят в довольно узком диапазоне соотношений белка и 60S субъединиц рибосом – от 4500 : 1 до 4000 : 1 (табл. 1). Так, на рис. 1 представлены фрагменты спектра ^{15}N - ^1H HSQC М-домена eRF1 в отсутствие рибосомы (1а) и при дальнейшем титровании белка 60S субъединицами рибосомы (1б–г). В указанном выше диапазоне соотношений концентрации белка и рибосомы наблюдается снижение интенсивности большинства сигналов М-домена. Интенсивность некоторых сигналов М-домена eRF1 изменяется в значительной степени. Так, в спектрах смеси белка и рибосомы при соотношении 4000 : 1 (рис. 1в) и 4250 : 1 (рис. 1г) ряд амидных сигналов белка вообще отсутствует (их резонансные положения в спектрах отмечены кружками).

При молярном соотношении М-домена и 60S субъединиц ниже 3000 : 1 сигналы на спектре HSQC практически полностью исчезают. Однако при дальнейшем постепенном увеличении ионной силы раствора путем изменения концентрации NaCl (от 50 до 75 mM) интенсивность сигналов в спектрах восстанавливается. Увеличение ионной силы раствора уменьшает прочность связывания белка с субъединицей рибосомы и, тем самым, приводит к высвобождению связанного белка. Постепенное восстановление интенсивности сигналов в спектрах наблюдается также с течением времени: через 5 ч после добавления 60S субъединиц к М-домени спектры HSQC становятся практически идентичны контрольным спектрам белка без добавления рибосом. Наиболее вероятно, что такой эффект связан с процессом разрушения 60S субчастиц рибосом во времени. Изменения интенсивностей сигналов в спектрах HSQC обратимы: при добавлении М-домена eRF1 к смеси белка и 60S субъединиц рибосомы, в спектре HSQC которого практически полностью отсутствовали сигналы, они появляются вновь. Обратное титрование 60S субъединиц М-доменом вызывает аналогичный эффект: интенсивность сигналов уменьшается при тех же молярных соотношениях, которые были найдены и при прямом титровании.

С помощью метода ЯМР исследовано также взаимодействие М-домена eRF1 с 40S субъединицами рибосом. Добавление к раствору М-домена 40S субъединиц рибосом в молярных соотношениях белок/рибосома 3500 : 1 и даже 1750 : 1 не приводит к

каким-либо видимым изменениям в спектрах ^{15}N - ^1H HSQC.

Далее изучали взаимодействие функционально неактивного мутанта G183A М-домена eRF1 с 60S субъединицами рибосом. Мониторинг изменения интенсивности сигналов в спектрах HSQC проводили в растворах белок/рибосома при их молярных соотношениях 8000 : 1, 5000 : 1, 4000 : 1, 3000 : 1 и 1500 : 1. Уменьшение интенсивности сигналов в спектрах HSQC наблюдалось лишь при увеличении относительной концентрации 60S субъединиц рибосомы к белку более 0.025% (т.е. при соотношениях белок/рибосома 4000 : 1, 3000 : 1 и 1500 : 1). При этом в спектре раствора М-домена eRF1/рибосома 4000 : 1 наблюдается изменение интенсивности лишь нескольких сигналов (табл. 2). При соотношении белок/рибосома 3000 : 1 таких сигналов насчитывается немногим более десяти. В число аминокислотных остатков, у которых интенсивность амидных протонов основной белковой цепи изменяется в наибольшей степени, входят Ala183, Gly184, Ser186, Thr208, Gly216, Thr234, Ser239. В случае Arg198, Asn220 и Arg245 наблюдается также уменьшение интенсивности сигналов NH боковых цепей. Следует отметить, что даже при соотношении белок/рибосома 1500:1 в спектрах удается наблюдать значительное число сигналов мутантной формы G183A М-домена eRF1, что отличает ее от дикой формы белка, для которого уже при соотношении белок/рибосома 3000 : 1 в спектрах HSQC практически все сигналы исчезают.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Природа уменьшения интенсивности сигналов в спектрах ЯМР при взаимодействии М-домена eRF1 с 60S субъединицами рибосом

Как отмечалось выше, ряд исследователей использовали спектроскопию ЯМР для определения интерфейса взаимодействия рибосомных белков с субъединицами рибосомы [24, 25]. Для успешного применения методов ЯМР необходимо, чтобы свободная и связанная с рибосомой формы белка находились в состоянии быстрого (в шкале времени ЯМР) обмена. Наблюдаемые сигналы ЯМР в этом случае содержат усредненную информацию как о свободной, так и о связанной форме; при этом вклад каждой из форм пропорционален их содержанию в смеси. В том случае, когда измеряемый спектральный параметр связанной формы белка значительно отличается от аналогичного параметра свободной формы, даже небольшое содержание связанной формы может существенно изменить наблюдаемый параметр. Это обстоятельство позволяет наблюдать эффекты связывания даже при большом молярном избытке белка по отношению к рибосоме. Некоторые авторы предполагали, что основным параметром, изменение которого опреде-

Таблица 1. Относительная интегральная интенсивность сигналов аминокислотных остатков (А.о.) М-домена eRF1 при взаимодействии его с 60S субъединицей рибосомы эукариот при различных соотношениях рибосомы и белка

А.о.		Соотношение рибосома/белок:			А.о.		Соотношение рибосома/белок:		
		1/4500	1/4250	1/4000			1/4500	1/4250	1/4000
S	144	0.55	0.45	0.30	Q	211	0.37	0.44	0.51
K	145	0.43	0.39	0.29	L	212	0.30	0.24	0.00
F	146	0.03	0.00	0.00	F	213	0.62	0.36	0.07
G	147	0.37	0.25	0.16	I	214	0.36	0.39	0.21
F	148	0.47	0.44	0.31	S	215	0.34	0.31	0.31
V	150	0.27	1.17	0.37	G	216	0.27	0.56	0.17
D	152	0.38	0.85	0.17	K	218	0.50	0.36	0.26
G	153	0.15	0.50	0.90	N	220	0.19	0.35	0.22
S	154	0.50	0.35	0.30	V	221	0.25	0.27	0.90
G	155	0.53	0.34	0.21	A	222	0.28	0.28	0.47
G	159	0.34	0.48	0.28	G	223	0.29	0.49	0.32
T	160	0.33	0.41	0.20	L	224	0.30	0.58	0.26
L	161	0.22	0.42	0.78	V	225	0.09	0.07	0.00
Q	162	0.33	0.28	0.00	L	226	0.46	0.30	0.00
G	163	0.51	0.36	0.21	G	228	0.33	0.50	0.35
N	164	0.36	0.50	0.21	A	230	0.56	0.49	0.35
T	165	0.38	0.30	0.21	K	233	0.06	0.00	0.00
R	166	0.37	0.28	0.26	T	234	0.22	0.00	0.00
E	167	0.34	0.49	0.34	L	236	0.00	0.15	0.08
V	168	0.39	0.51	0.94	S	237	0.41	0.16	0.27
L	169	1.02	0.23	0.00	Q	238	0.33	0.28	0.25
H	170	0.50	0.38	0.00	M	241	0.40	0.22	0.44
F	172	0.46	0.32	0.25	F	242	0.36	0.61	0.24
T	173	0.45	0.46	0.21	Q	244	0.28	0.47	0.21
V	174	0.07	0.16	0.21	R	245	0.29	0.31	0.31
D	175	0.40	0.48	0.23	S	248	0.38	0.37	0.35
K	178	0.42	0.36	0.21	K	249	0.37	0.29	0.28
G	181	0.38	0.44	0.23	V	250	0.33	0.52	0.00
G	183	0.60	0.53	0.39	L	251	0.34	0.00	0.00
G	184	0.47	0.30	0.10	K	252	0.37	0.32	0.37
S	186	0.71	0.46	0.21	L	253	0.42	0.29	0.12
A	187	0.50	0.33	0.69	V	254	0.24	0.38	0.17
R	192	0.06	0.36	0.18	D	255	0.37	0.22	0.18
L	193	0.52	0.32	0.18	S	257	0.41	0.27	0.31
E	196	0.14	0.49	0.28	Y	258	0.31	0.12	0.49
K	197	0.37	0.21	0.10	G	259	0.36	0.30	0.22
H	199	0.42	0.29	0.14	G	260	0.40	0.47	0.93
N	200	0.27	0.21	0.22	E	261	0.39	0.66	0.37
Y	201	0.38	0.27	0.29	N	262	0.22	0.17	0.18
R	203	0.32	0.29	0.11	I	268	0.58	0.04	0.00
K	204	0.51	0.35	0.00	E	269	0.20	0.26	0.27
V	205	0.31	0.00	0.00	L	270	0.44	0.31	0.18
E	207	0.93	0.36	0.27	S	271	0.17	0.63	0.52
T	208	0.17	0.00	0.00	T	272	0.56	0.63	0.34
A	209	0.14	0.32	0.20	V	274	0.25	0.32	0.30
V	210	0.26	0.29	0.00	His ₆		0.91	0.78	0.70

Примечание. За единицу принята интенсивность тех же сигналов белка в отсутствие рибосомы. Жирным шрифтом отмечены аминокислотные остатки, для которых наблюдается наиболее заметное уменьшение интенсивности сигналов. Нумерация остатков соответствует полноразмерному белку eRF1 человека. В таблице приведены данные только для тех остатков, интегральная интенсивность сигналов которых в спектрах HSQC может быть достоверно измерена.

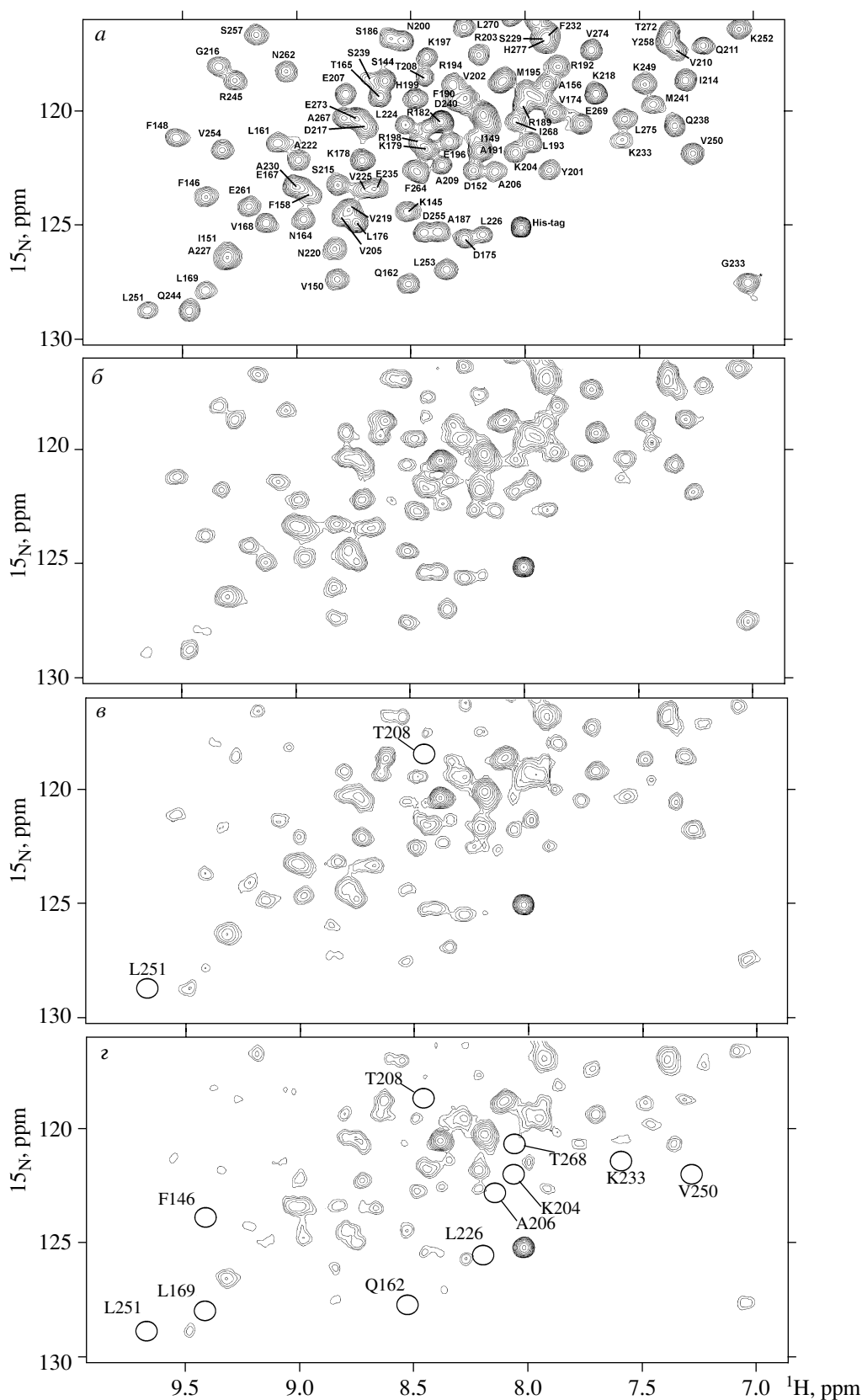


Рис. 1. Фрагмент спектра ^{15}N - ^1H HSQC М-домена eRF1 человека в присутствии 60S субъединиц рибосомы эукариот. *a* – Раствор белка в отсутствие 60S субъединиц рибосомы эукариот; *б* – соотношение рибосома/белок 1 : 4500; *в* – соотношение рибосома/белок 1 : 4250; *г* – соотношение рибосома/белок 1 : 4000. Кружками отмечены исчезающие сигналы или сигналы тех аминокислотных остатков, интенсивность которых уменьшается на порядок при взаимодействии белка с рибосомой.

Таблица 2. Интегральная интенсивность сигналов аминокислотных остатков (А.о.) мутанта G183A М-домена eRF1 при взаимодействии его с 60S субъединицей рибосомы эукариот при различных соотношениях рибосомы и белка, нормированная на интенсивность тех же сигналов в отсутствие рибосомы

А.о.		Соотношение рибосома/белок:			А.о.		Соотношение рибосома/белок:		
		1/5000	1/4000	1/3000			1/5000	1/4000	1/3000
S	144	0.72	0.70	0.69	F	213	0.83	0.58	0.54
F	146	0.78	0.77	0.54	I	214	0.76	0.69	0.50
G	147	0.90	0.95	0.96	S	215	0.86	0.83	0.54
F	148	1.02	0.83	0.71	G	216	0.75	0.41	0.00
V	150	0.96	0.80	0.81	K	218	0.81	0.68	0.56
G	153	0.80	0.80	0.80	N	220	0.91	0.93	0.62
S	154	0.91	0.74	0.70	V	221	0.88	0.80	0.73
G	155	0.83	0.82	0.71	A	222	0.86	0.80	0.63
G	159	0.87	0.74	0.57	G	223	0.85	0.78	0.62
T	160	0.82	0.70	0.66	L	224	0.87	0.60	0.43
L	161	0.88	0.78	0.71	L	226	1.09	0.70	0.87
Q	162	0.87	0.69	0.58	G	228	0.89	0.81	0.73
G	163	0.82	0.57	0.59	A	230	0.66	0.57	0.41
N	164	0.78	0.64	0.59	T	234	0.81	0.51	0.00
T	165	0.87	0.72	0.47	E	235	0.53	0.49	0.30
R	166	0.81	0.70	0.53	L	236	0.88	0.77	0.56
V	168	0.77	0.75	0.56	S	237	0.88	0.72	0.60
L	169	0.69	0.57	0.81	Q	238	0.75	0.73	0.52
H	170	1.03	0.77	0.74	S	239	0.45	0.12	0.00
F	172	0.75	0.66	0.47	M	241	1.06	0.82	0.63
T	173	0.85	0.80	0.59	F	242	0.82	0.68	0.69
D	175	0.63	0.59	0.38	Q	244	0.84	0.84	0.67
L	176	0.86	0.67	0.56	R	245	0.83	0.79	0.68
K	178	0.91	0.72	0.53	S	248	0.97	0.80	0.74
G	181	0.79	0.61	0.53	K	249	0.96	1.02	0.74
A	183	0.60	0.50	0.29	V	250	0.99	0.96	0.66
G	184	0.77	0.71	0.47	L	251	1.10	0.73	1.01
S	186	0.74	0.63	0.00	K	252	0.94	0.87	0.80
F	190	0.70	0.57	0.55	L	253	1.01	0.94	0.76
R	192	0.72	0.67	0.52	V	254	0.85	0.73	0.58
L	193	0.84	0.81	0.57	D	255	0.76	0.67	0.51
E	196	1.01	0.61	0.50	S	257	0.89	0.69	0.58
H	199	0.79	0.58	0.47	Y	258	0.44	0.73	0.64
N	200	0.89	0.62	0.61	G	259	0.74	0.70	0.46
Y	201	0.72	0.67	0.47	G	260	0.81	0.89	0.68
R	203	0.78	0.51	0.50	E	261	0.85	0.71	0.60
K	204	0.88	0.80	0.58	N	262	0.77	0.50	0.51
E	207	0.82	0.66	0.65	A	267	0.92	0.61	0.51
T	208	0.77	0.20	0.25	E	269	0.77	0.71	0.50
A	209	0.75	0.77	0.61	S	271	0.83	0.75	0.68
V	210	1.08	0.80	0.40	E	273	0.45	0.38	0.35
Q	211	0.80	0.77	0.58	V	274	1.03	0.82	0.81
L	212	0.90	0.77	0.48	His ₆		0.92	0.84	0.78

Примечание. Жирным шрифтом отмечены аминокислотные остатки, для которых наблюдается наиболее заметное уменьшение интенсивности сигналов. Нумерация остатков соответствует полноразмерному белку eRF1 человека. В таблице приведены данные только для тех остатков, интегральная интенсивность сигналов которых в спектрах HSQC может быть достоверно измерена.

ляет принадлежность аминокислот к интерфейсу взаимодействия белок-рибосома, является химический сдвиг [23]. Однако расчеты показывают, что при тысячекратных избытках белка по отношению к рибосоме даже значительное изменение химического сдвига, происходящее при связывании белка, не может объяснить наблюдаемое уменьшение интенсивности сигнала. Мы полагаем, что главным фактором в данном случае является изменение параметров релаксации ядер, и прежде всего – существенное увеличение скорости поперечной релаксации R_2 [31]. В случае субъединиц рибосомы, молекулярная масса которых измеряется миллионами Дальтон, время корреляции вращательной диффузии составляет сотни нс, вследствие чего скорости поперечной релаксации ядер могут достигать нескольких сотен Гц. В этом случае импульсные последовательности ЯМР, основанные на переносе намагниченности посредством спин-спинового взаимодействия, оказываются неэффективными, и это приводит к исчезновению сигналов в спектрах. Аминокислотные остатки белка, находящиеся в непосредственном контакте с рибосомой, в этом случае будут в полной мере испытывать указанные влияния. В случае более удаленных остатков такой эффект может быть менее выражен вследствие внутренней подвижности белковой цепи, приводящей к уменьшению R_2 по мере удаления аминокислотных остатков от интерфейса взаимодействия с рибосомой. Вместе с тем, если подвижность участка белка мала (например, в β -листных фрагментах), то может наблюдаться существенное уменьшение интенсивности и для аминокислотных остатков, расположенных не на поверхности белка, а в таком жестком фрагменте.

М-домен eRF1 специфично связывается с 60S субъединицами рибосом

Эксперименты ЯМР свидетельствуют о том, что М-домен фактора терминации трансляции eRF1 человека специфично связывается с 60S субъединицами рибосомы эукариот и не связывается с 40S субъединицами. Так, при взаимодействии М-домена с 60S субъединицами рибосом уже при молярных соотношениях белок/рибосома 4500 : 1 интенсивность сигналов амидных протонов белка уменьшается, что вызвано его связыванием с высокомолекулярными частицами (табл. 1). В растворе белка и 60S субъединиц рибосомы с молярным соотношением 3000 : 1 практически все сигналы белка исчезают. В то же время, добавление к М-домену eRF1 40S субъединиц рибосом при их молярных соотношениях 3500 : 1 и даже 1750 : 1 видимых изменений в спектрах HSQC не происходит. Эти данные однозначно указывают на отсутствие специфического связывания М-домена eRF1 с 40S субъединицами рибосомы.

Аминокислотные остатки М-домена eRF1, формирующие интерфейс взаимодействия белка с 60S субъединицами рибосомы

В табл. 1 представлены данные, характеризующие изменение интенсивности сигналов амидных протонов в спектрах ^{15}N - ^1H HSQC М-домена eRF1 при титровании его 60S субъединицами рибосомы. Следует отметить, что мониторинг изменения интенсивности проводили только для хорошо разрешенных сигналов, однако количество амидных сигналов, хорошо разрешенных в спектрах HSQC, составляет около 70% от их общего числа, поэтому данную выборку можно считать репрезентативной. Видно, что при увеличении содержания 60S субъединиц рибосомы от 0.022% (соотношение белок/рибосома 4500/1) до 0.025% (4000/1) интенсивность всех сигналов белка уменьшается. Однако в то время как изменение интенсивности одних сигналов белка относительно невелико, у других оно выражено существенно более заметно. Так, например, уменьшение интенсивности сигналов подвижных концевых остатков гистидина (His_6) мало, в отличие от сигналов аминокислотных остатков F146, Q162, L169, H170 и других, выделенных в табл. 1 жирным шрифтом. Большинство из аминокислотных остатков, интенсивность сигналов амидных протонов которых максимально снижается вследствие взаимодействия белка с 60S субъединицами рибосомы, расположены на поверхности белка и сосредоточены, преимущественно, на одной ее полусфере (рис. 2). Уменьшение интенсивности сигналов F146, V225 и L226, расположенных не на поверхности белка, а в его β -ядре, может быть обусловлено их малой подвижностью и близостью к интерфейсу взаимодействия с рибосомой.

На рис. 3а показано строение М-домена eRF1 человека в виде комбинации элементов вторичной структуры. Атомы углерода C α аминокислотных остатков, испытывающих наибольшее влияние рибосомы в опытах по титрованию, показаны шарами. Обращает на себя внимание тот факт, что большинство таких остатков расположено на длинной α -спирали – $\alpha 1$. Два других кластера таких аминокислотных остатков располагаются в районе короткой спирали $\alpha 2$ (остатки 233–235) и на стыке спирали $\alpha 3$ и листа $\beta 5$ (остатки 250 и 251). Можно предполагать, что именно эти участки белка, и, прежде всего, спираль $\alpha 1$, участвуют во взаимодействии М-домена eRF1 с 60S субъединицей рибосомы эукариот.

Длинная α -спираль, подобная $\alpha 1$, существует в третьем домене факторов терминации трансляции прокариот RF1 и RF2, который содержит GGQ-петлю и взаимодействует с большой субъединицей рибосомы [13, 32]. Кроме того, такая же спираль есть в центральном домене гомологичного eRF1 белка Dom34, который тоже связывается с большой субъединицей рибосомы [33]. Несмотря на практически

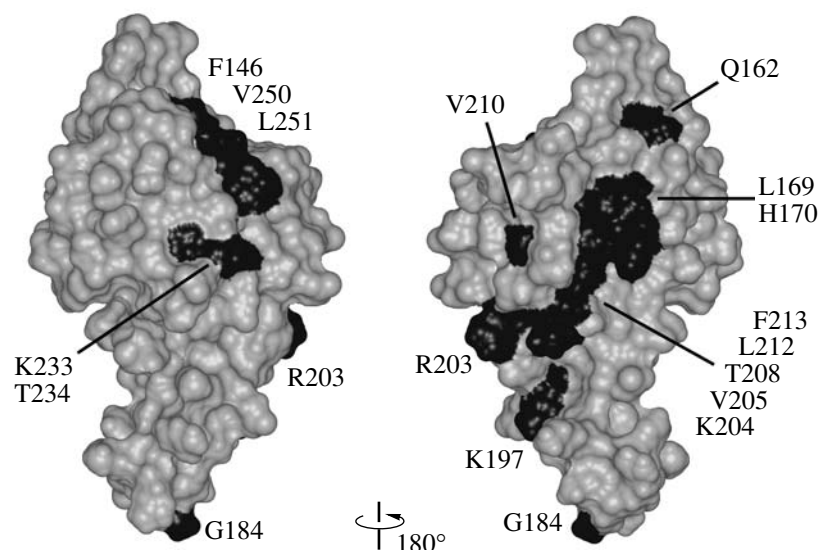


Рис. 2. Молекулярная поверхность, доступная растворителю, М-домена eRF1 человека, построенная с использованием алгоритма Конноли [30]. Темным цветом показаны аминокислотные остатки, интенсивность которых изменяется в наибольшей степени при взаимодействии белка с 60S субъединицей рибосомы.

полное отсутствие структурной гомологии между факторами эукариот и прокариот [32], положение этой длинной α -спирали совпадает. Так, наложение координат атомов C α спирали α 1 М-домена eRF1 на аналогичные координаты RF1 в терминационном

комплексе рибосомы *Thermus thermophilus* [13], представленное на рис. 4, показывает близкую ориентацию длинной α -спирали по отношению к GGQ петле и почти точное совпадение положения трипептидных фрагментов GGQ в прокариотическом и эукариотическом белках.

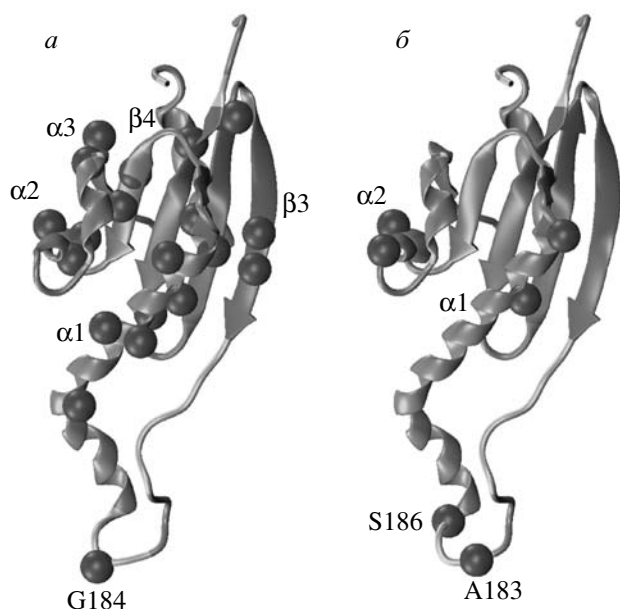


Рис. 3. Аминокислотные остатки, интенсивность которых уменьшается в наибольшей степени при взаимодействии М-домена eRF1 человека с 60S субъединицей рибосомы. Крупными шарами показаны атомы C α таких аминокислотных остатков. *a* – Белок дикого типа; *б* – мутант G183A.

Сравнение результатов изучения взаимодействия 60S субъединиц рибосомы с М-доменом eRF1 человека дикого типа и с мутантом G183A позволяет сделать ряд выводов. Во-первых, мутант G183A характеризуется, как и дикий тип белка, специфическим связыванием с 60S частицами рибосомы. Во-вторых, прочность такого взаимодействия с рибосомой у мутанта оказывается существенно ниже, чем у белка дикого типа. Невозможно выполнить точную количественную оценку степени уменьшения константы связывания белка с рибосомой, вызванного мутацией, однако сам факт такого уменьшения не вызывает сомнения. Так, если при взаимодействии М-домена eRF1 дикого типа с рибосомой в соотношении 4000 : 1 интенсивность большинства сигналов белка существенно падает, то в случае мутанта G183A аналогичное изменение интенсивностей сигналов амидных протонов достигается лишь при соотношении 1500 : 1, т.е. при почти трехкратном увеличении концентрации рибосомы. В-третьих, у мутанта G183A изменяется и сам список аминокислотных остатков, подверженных влиянию рибосомы. Число таких остатков у мутанта G183A меньше, чем у белка дикого типа. На рис. 3в показано расположение аминокислотных остатков, наиболее заметно меняющих свою интенсивность при титровании мутанта G183A 60S субъединицами ри-

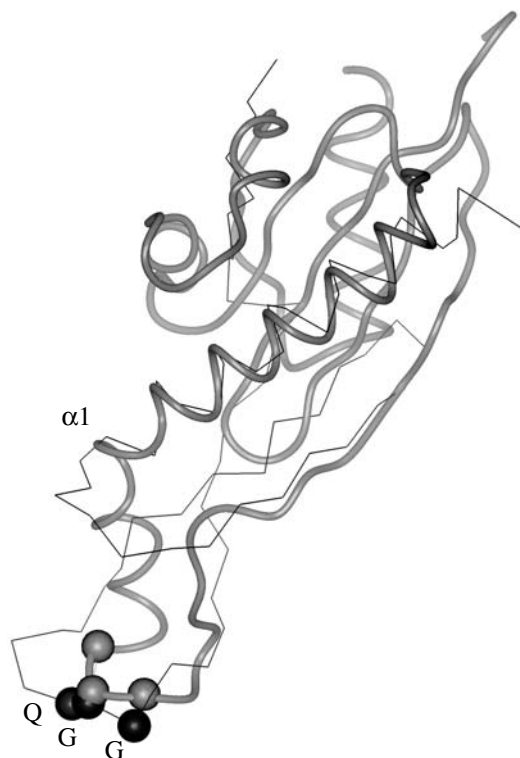


Рис. 4. Наложение координат атомов $\alpha 1$ структуры М-домена eRF1 человека в растворе [22] на координаты атомов $\alpha 1$ кристаллической структуры RF1 в терминационном комплексе рибосомы *Thermus thermophilus* [13]. Для суперпозиции двух белков использован фрагмент длинной α -спирали ($\alpha 1$ для eRF1) в каждой из структур. Белковая цепь eRF1 показана в виде трубки серого цвета, конформация RF1 – в виде сочленения атомов $\alpha 1$ тонкими линиями черного цвета. Атомы $\alpha 1$ строго консервативного трипептидного фрагмента GGQ показаны в виде шаров.

босомы. Заметно, что геометрия взаимодействия мутанта G183A несколько отличается от белка дикого типа. В частности, у мутантной формы не наблюдается преимущественной кластеризации взаимодействующих аминокислотных остатков на длинной $\alpha 1$ -спирали. Ранее показано, что мутация G183A не приводит к заметному изменению структуры М-домена eRF1, но ограничивает конформационную подвижность GGQ петли [22]. Можно предполагать, что такое ограничение подвижности петли не позволяет реализовать более прочное связывание М-домена с 60S субчастицей рибосомы через спираль $\alpha 1$, и, таким образом, препятствует правильному позиционированию М-домена eRF1 в рибосоме.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (№ 08-04-01091, Е.А., № 06-04-48037, Л.К., № 08-04-00582-а, В.П.) и Программы по молекулярной и клеточной биологии Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kisselev L., Ehrenberg M., Frolova L. 2003. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J.* **22**, 175–182.
2. Song H., Mugnier P., Das A.K., Webb H.M., Evans D.R., Tuite M.F., Hemmings B.A., Barford D. 2000. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell.* **100**, 311–321.
3. Bertram G., Bell H.A., Ritchie D.W., Fullerton G., Stansfield I. 2000. Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA.* **6**, 1236–1247.
4. Chavatte L., Seit-Nebi A., Dubovaya V., Favre A. 2002. The invariant uridine of stop codons contacts the conserved NIKSR loop of human eRF1 in the ribosome. *EMBO J.* **21**, 5302–5311.
5. Frolova L., Seit-Nebi A., Kisselev L. 2002. Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1. *RNA.* **8**, 129–136.
6. Kolosov P., Frolova L., Seit-Nebi A., Dubovaya V., Kononenko A., Oparina N., Justesen J., Efimov A., Kisselev L. 2005. Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6418–6425.
7. Ebihara K., Nakamura Y. 1999. C-terminal interaction of translational release factors eRF1 and eRF3 of fission yeast: G-domain uncoupled binding and the role of conserved amino acids. *RNA.* **5**, 739–750.
8. Ito K., Ebihara K., Nakamura Y. 1998. The stretch of C-terminal acidic amino acids of translational release factor eRF1 is a primary binding site for eRF3 of fission yeast. *RNA.* **4**, 958–972.
9. Merkulova T.I., Frolova L.Y., Lazar M., Camonis J., Kisselev L.L. 1999. C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their *in vivo* interaction. *FEBS Lett.* **443**, 41–47.
10. Frolova L., Le Goff X., Zhouravleva G., Davydova E., Philippe M., Kisselev L. 1996. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA.* **2**, 334–341.
11. Frolova L.Y., Tsivkovskii R.Y., Sivolobova G.F., Oparina N.Y., Serpinsky O.I., Blinov V.M., Tatkov S.I., Kisselev L.L. 1999. Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA.* **5**, 1014–1020.
12. Mora L., Zavialov A., Ehrenberg M., Buckingham R.H. 2003. Stop codon recognition and interactions with peptide release factor RF3 of truncated and chimeric RF1 and RF2 from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **50**, 1467–1476.
13. Petry S., Brodersen D.E., Murphy F.V.T., Dunham C.M., Selmer M., Tarry M.J., Kelley A.C., Ramakrishnan V. 2005. Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell.* **123**, 1255–1266.
14. Klaholz B.P., Pape T., Zavialov A.V., Myasnikov A.G., Orlova E.V., Vestergaard B., Ehrenberg M., van Heel M. 2003. Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termi-

- nation complex with release factor 2. *Nature*. **421**, 90–94.
15. Rawat U.B., Zavialov A.V., Sengupta J., Valle M., Grassucci R.A., Linde J., Vestergaard B., Ehrenberg M., Frank J. 2003. A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature*. **421**, 87–90.
 16. Mora L., Heurgue-Hamard V., Champ S., Ehrenberg M., Kisselev L.L., Buckingham R.H. 2003. The essential role of the invariant GGQ motif in the function and stability *in vivo* of bacterial release factors RF1 and RF2. *Mol. Microbiol.* **47**, 267–275.
 17. Seit-Nebi A., Frolova L., Justesen J., Kisselev L. 2001. Class-1 translation termination factors: invariant GGQ minidomain is essential for release activity and ribosome binding but not for stop codon recognition. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3982–3987.
 18. Zavialov A.V., Mora L., Buckingham R.H., Ehrenberg M. 2002. Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. *Mol. Cell.* **10**, 789–798.
 19. Frolova L.Y., Merkulova T.I., Kisselev L.L. 2000. Translation termination in eukaryotes: polypeptide release factor eRF1 is composed of functionally and structurally distinct domains. *RNA*. **6**, 381–390.
 20. Дубовая В.И., Колосов П.М., Алкалаева Е.З., Фролова Л.Ю., Киселев Л.Л. 2006. Влияние изолированных доменов фактора терминации трансляции eRF1 на ГТФазную активность фактора терминации трансляции eRF3. *Молекуляр. биология*. **40**, 310–316.
 21. Nauryliuk V., Zavialov A., Kisselev L., Ehrenberg M. 2006. Class-1 release factor eRF1 promotes GTP binding by class-2 release factor eRF3. *Biochimie*. **88**, 747–757.
 22. Ivanova E.V., Kolosov P.M., Birdsall B., Kelly G., Pastore A., Kisselev L.L., Polshakov V.I. 2007. Eukaryotic class 1 translation termination factor eRF1 – the NMR structure and dynamics of the middle domain involved in triggering ribosome-dependent peptidyl-tRNA hydrolysis. *FEBS J.* **274**, 4223–4237.
 23. Paci M., Pon C., Gualerzi C. 1985. The interaction between initiation factor 3 and 30 S ribosomal subunits studied by high-resolution ¹H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **260**, 887–892.
 24. Sette M., van Tilborg P., Spurio R., Kaptein R., Paci M., Gualerzi C.O., Boelens R. 1997. The structure of the translational initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J.* **16**, 1436–1443.
 25. Sette M., Spurio R., van Tilborg P., Gualerzi C.O., Boelens R. 1999. Identification of the ribosome binding sites of translation initiation factor IF3 by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *RNA*. **5**, 82–92.
 26. Bodenhausen G., Ruben D. 1980. Natural abundance Nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185–189.
 27. Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G.W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. 1995. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR*. **6**, 277–293.
 28. Ivanova E.V., Kolosov P.M., Birdsall B., Kisselev L.L., Polshakov V.I. 2006. Letter to the editor: NMR assignments of the middle domain of human polypeptide release factor eRF1. *J. Biomol. NMR*. **34**, 128.
 29. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 27–38.
 30. Connolly M.L. 1983. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science*. **221**, 709–713.
 31. Luginbühl P., Wüthrich K. 2002. Semi-classical nuclear spin relaxation theory revisited for use with biological macromolecules. *Prog. NMR Spectroscop.* **40**, 199–247.
 32. Vestergaard B., Van L.B., Andersen G.R., Nyborg J., Buckingham R.H., Kjeldgaard M. 2001. Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1. *Mol. Cell.* **8**, 1375–1382.
 33. Graille M., Chaillet M., van Tilbeurgh H. 2008. Structure of yeast Dom34: a protein related to translation termination factor eRF1 and involved in No-Go decay. *J. Biol. Chem.* **283**, 7145–7154.