

**Функциональные последствия введения остатков цистеина во
внутритуннельный сегмент рибосомного белка L22**

Научный руководитель – Колб Вячеслав Адамович

Буянова Елизавета Алексеевна

Студент (магистр)

Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

E-mail: buyanovamsu@gmail.com

Рибосома - органоид клетки, служащий для важнейшего клеточного процесса - матричного биосинтеза белка. Важный элемент рибосомной архитектуры - рибосомный туннель - расположен внутри большой рибосомной субчастицы. Начинаясь в районе пептидилтрансферазного центра и заканчиваясь на противоположной стороне большой субчастицы, рибосомный туннель, как следует из данных криоэлектронной микроскопии, служит путем выхода растущего полипептида из рибосомы.

Рибосома является мишенью многих антибиотиков. Макролидные антибиотики, ингибирующие элонгацию трансляции, связываются внутри рибосомного туннеля (Schlünzen *et al.*, 2001) и, как считается, служат физическим препятствием для прохождения растущего полипептида. В то же время известно, что синтез полифенилаланина не ингибируется макролидами, что послужило основой гипотезы о существовании альтернативного - не через рибосомный туннель - пути выхода растущего полипептида из рибосомы (Odom *et al.*, 1991).

Физическое препятствие внутри рибосомного туннеля может быть смоделировано путем ковалентной сшивки растущего полипептида с каким-либо компонентом туннеля, например, с рибосомным белком L22. Возникает вопрос, будут ли условия, благоприятные для формирования дисульфидной связи между остатком цистеина рибосомного белка L22 и цистеиновым остатком растущего полипептида, влиять на трансляцию?

Цель данной работы - получить штаммы, мутантные по рибосомному белку L22, введя в его состав остатки цистеина, чьи боковые радикалы были бы обращены в просвет рибосомного туннеля.

Для введения аминокислотных замен были выбраны следующие аминокислотные остатки белка L22: K83, R84, I85, R95. Ожидается, что боковые радикалы цистеиновых остатков, введенных в эти положения, будут обращены в рибосомный туннель в самой узкой его части и не будут взаимодействовать с другими элементами рибосомной архитектуры. В качестве основы для моделирования использовалась структура большой субчастицы рибосомы (PDB ID: 3J7Z, Arenz *et al.*, 2014). В ходе работы были получены штаммы *E. coli* BW25113, содержащие рибосомы с двумя вариантами одиночной аминокислотной замены в белке L22 (R95C и R84C) и с тройной заменой: K83C R84C I85C.

Штаммы *E. coli* BW25113, содержащие рибосомы с заменами выбранных аминокислотных остатков белка L22 на остатки цистеина, были получены следующим образом. Последовательность рибосомного оперона S10, содержащего ряд рибосомных генов, в их числе и ген белка L22 - *rplV*, - была амплифицирована с помощью ПЦР с матрицы геномной ДНК *E. coli* BW25113 и введена в вектор pCOLA по методу Гибсона (Gibson *et al.*, 2009). Затем ген *rplV* в полученной плазмиде pCOLA-S10 методом рестрикции-лигирования был заменен на его мутантные варианты или ген *rplV* дикого типа (штамм, содержащий такую плазмиду, а также рибосомы, выделенные из этого штамма, будем называть псевдодиким типом). В качестве матрицы для амплификации последовательности гена *rplV* и последующего сайт-направленного мутагенеза была использована плаزمид

pSA24-*rplV*, выделенная из соответствующего штамма библиотеки ASKA (Kitagawa *et al.*, 2005). Правильность нуклеотидных последовательностей полученных плазмид была проверена секвенированием. Наконец, полученные плазмиды были введены в клетки *E. coli* BW25113 методом электропорации.

Присутствие мутантного белка L22 в препаратах рибосом, выделенных из полученных штаммов, было подтверждено масс-спектрометрически. Было показано, что мутантные рибосомы способны к трансляции *in vitro* (о трансляционной активности мутантных рибосом судили по активности люциферазы, синтезируемой в бесклеточной системе), причем уровень синтеза белка на мутантных рибосомах не отличался от такового на рибосомах псевдодикого типа.

Таким образом, в результате настоящей работы была получена система, теоретически позволяющая зафиксировать N-конец растущего полипептида и, тем самым, механически останавливать продвижение растущего полипептида внутри рибосомного туннеля. В дальнейшем планируется проведение трансляции *in vitro* в окислительных условиях, необходимых для формирования ковалентной сшивки между рибосомным белком L22 и растущим полипептидом. Кроме того, рибосомы с ковалентно зафиксированным растущим полипептидом внутри рибосомного туннеля могут быть использованы в качестве объекта для криоэлектронной микроскопии.

Источники и литература

- 1) Arenz, S., Meydan, S., Starosta, A.L., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vazquez-Laslop, N., Wilson, D.N. (2014). Drug Sensing by the Ribosome Induces Translational Arrest via Active Site Perturbation. *Mol. Cell*, 56:446-452.
- 2) Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A. & Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5):343–345.
- 3) Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* 12(5):291-9.
- 4) Odom, O.W., Picking, W.D., Tsalkova, T. & Hardesty, B. (1991). The synthesis of polyphenylalanine on ribosomes to which erythromycin is bound. *Eur. J. Biochem.*, 198, 713–722.
- 5) Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413, 814-821.