

创新团队成果专栏

人源MDN1蛋白质的电镜结构研究

许云涛, 李明月, 雷 鸣

上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院, 上海 200125

[摘要] 目的·利用负染电镜技术分析人源midasin AAA-ATPase 1 (MDN1, 又称Real) 蛋白质结构。方法·利用CRISPR/Cas9基因编辑方法在Expi293F细胞内源MDN1蛋白质的氨基端敲入3×FLAG纯化标签, 采用ANTI-FLAG® M2 Agarose Affinity Gel亲和层析和甘油密度梯度离心的方法分离纯化目的蛋白质; 通过负染色电镜技术和单颗粒(single-particle) 重构技术探究人源MDN1蛋白质结构。结果·利用亲和层析及密度梯度离心方法分离纯化获得高纯度、均一性较好的人源MDN1蛋白质样品; 采用甲酸铀负染色后利用120 kV电镜初步解析了目的蛋白质MDN1的空间结构。结论·利用单颗粒重构技术搭建了人源MDN1蛋白质的低分辨率的负染模型。

[关键词] MDN1蛋白质; pre-60S核糖体; 核糖体成熟; 负染电镜

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.05.001 **[中图分类号]** Q518.2 **[文献标志码]** A

Electron microscopic study of the human MDN1 protein

XU Yun-tao, LI Ming-yue, LEI Ming

Shanghai Institute of Precision Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China

[Abstract] **Objective**·To study the structure of the human midasin AAA-ATPase 1 (MDN1, Real) protein by negative-staining electron microscopy. **Methods**·Using the CRISPR/Cas9 genome editing method, a 3×FLAG affinity tag was inserted into the N-terminus of MDN1 in Expi293F cells. Tagged proteins were isolated via affinity purification with ANTI-FLAG® M2 Agarose Affinity Gel, followed by glycerol density gradient centrifugation. The purified protein sample was then subjected to negative-staining electron microscopy and single particle image analysis. **Results**·The FLAG-tagged endogenous MDN1 proteins with high purity and good homogeneity were obtained using affinity chromatography and density gradient centrifugation. Preliminary study on the structure of human MDN1 was achieved by 120 kV electron microscope after negative staining with uranium formate. **Conclusion**·A low resolution model of human MDN1 protein was achieved by single particle reconstruction analysis.

[Key words] MDN1 protein; pre-60S ribosome; ribosome maturation; negative-staining electron microscopy

核糖体是人体内负责蛋白质合成的重要细胞器,影响着机体生长和繁殖等一系列活动。核糖体的组装和成熟是一个高度复杂的过程,受到很多组装因子的精密调控^[1-3],该过程的异常会导致心血管、神经、骨骼、造血系统等方面的疾病,如骨髓增生异常综合征(Shwachman-Diamond syndrome, SDS)、先天性角化不良(dyskeratosis congenita, DC)等^[4-6]。在众多参与调控核糖体组装的蛋白质因子中,AAA-ATPase(ATPase associated with various activities)^[7]家族是受到广泛关注的一类蛋白质,该家族成员在不同阶段参与释放或者回收不同的pre-60S核糖体组装因子,推动核糖体的成熟过程。AAA-ATPase家族成员具有2个基本的特征:其一是氨基酸序列中含有1个或多个保守的AAA结构域,AAA结构域具有ATP水解酶活性,通过水解ATP获得能量来发挥其生理功能^[8];

其二是大多数AAA-ATPase能够形成寡聚体,互相结合,协同作用,最常见的是形成doughnut-shaped的六聚体环状结构,这是其发挥生理功能的结构基础^[9-11]。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,有3种AAA-ATPase参与pre-60S核糖体成熟过程,分别为Ribosome biogenesis ATPase Rix7(Rix7)、Developmentally-regulated GTP-binding protein 1(Drg1)和Real^[1]。Rix7是第1个与pre-60S核糖体相互作用的AAA-ATPase,主要与组装因子NOP seven-associated protein 1(Nsa1)释放有关^[12-13];Drg1主要在胞质中发挥作用,促进组装因子回收^[14-15];而Real促进Pescadillo homolog(NOP7) pre-60S complex和Pre-rRNA-processing protein(Rix1) pre-60S complex中的组装因子释放,是pre-60S核糖体在核仁以及核质成熟中的关键因子^[16]。

[基金项目] 国家自然科学基金(31525007)。

[作者简介] 许云涛(1995—),男,硕士生;电子信箱:xyt347590681@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 雷 鸣,电子信箱:leim@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China(31525007)。

[Corresponding Author] LEI Ming, E-mail: leim@shsmu.edu.cn。

[网络首发] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210429.1322.002.html> (2021-04-29 16:11:07)。

在上述3种AAA-ATPase中, Rea1作为在核内调控pre-60S核糖体组装因子释放的重要蛋白质, 其敲低、敲除可致酵母死亡, 在其他真核生物中对发育也有非常大的影响^[17-21]。实验表明, Rea1的metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) 结构域与pre-60S核糖体组装因子Ribosome biogenesis protein Ytm1-Erb1-Nop7 (Ytm1-Erb1-Nop7) 的MIDAS-interacting domain (MIDO) 结构域相互作用, Rea1将Ytm1从pre-60S核糖体上释放出来^[16,22]; 此外还发现Rea1在Rix1 pre-60S核糖体中丰度很高, 并且通过其ATPase环状结构域与Rix1 pre-60S核糖体相互作用^[18,22-23]。最近发表的酵母源(*Schizosaccharomyces pombe*)的结构信息显示, 该蛋白质由6个AAA结构域、连接肽(linker)、天冬氨酸/谷氨酸(D/E)以及MIDAS结构域组成^[24-25]; 通过AMPPNP和ATP-ribosinindole1(ATP-Rbin1)2种不同状态的对比发现, MIDAS结构域可能通过插入AAA环与pre-60S核糖体的组分相互作用, 从而介导多种组分从pre-60S核糖体释放^[26]。

Rea1在人源的同源蛋白质为midasin AAA-ATPase 1(MDN1), 是体内相对分子质量最大的蛋白质之一, 全长包含5 596个氨基酸残基, 相对分子质量为632 000。MDN1在pre-60S核糖体成熟中发挥着非常重要的作用, 但是其相关结构生物学研究进展缓慢, 这很大程度上限制了我们对pre-60S核糖体在核内成熟以及装配的理解。目前对MDN1结构和功能的了解, 较多是基于对酵母Rea1的研究结论, 因此, 解析人源MDN1的蛋白质结构, 对于阐明包括人类在内的哺乳动物MDN1调控pre-60S核糖体成熟过程的分子机制有着非常重要的意义。本研究通过哺乳细胞表达和蛋白质纯化体系, 获得全长人源MDN1蛋白质样品, 借助120 kV透射电子显微镜和单颗粒(single-particle)重构技术, 获得了MDN1蛋白质的负染三维结构模型, 为后续解析高分辨MDN1结构奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂和仪器 三羟基甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)、氯化钠(NaCl)、氯化镁(MgCl₂)、甘油(Glycerol)、二硫苏糖醇(DTT)、20×磷酸缓冲液(PBS)、吐温-20(Tween-20)均购自上海生工生物工程有限公司, cocktail购自瑞士Roche公司, 限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶均购自美国Thermo Fisher公司, 牛血清白蛋白、dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、ANTI-FLAG® M2 Agarose Affinity Gel均购自Sigma (上

海)公司, 悬浮细胞培养基购自CELL-WISE公司; 高速离心机、超速离心机购自美国Beckman Coulter公司, 冷冻离心机购自德国Eppendorf公司, 电泳仪与电泳槽购自Bio-Rad(中国)公司, 细胞流式分选仪购自美国BD公司, 细胞计数仪、高分辨轨道阱质谱仪均购自美国Thermo Fisher公司, 激光扫描共聚焦显微镜购自德国ZEISS公司, 碳膜铜网购自北京中镜科技技术有限公司, 透射电子显微镜购自美国FEI公司。

1.1.2 载体、菌株和细胞 pX330-mCherry载体、pUC57载体、*E.coli* DH5 α 菌种、Expi293F细胞均由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 引物合成和DNA序列测定 均由上海铂尚生物技术有限公司完成。

1.2.2 质粒的构建 针对MDN1基因的5'端设计包含sgRNA靶位点(cac cgc aag aag tgc tcc atg acc c)的引物, 体外退火后连接入pX330-mCherry载体^[27], 作为CRISPR/Cas9系统^[28]gRNA表达质粒。同时构建一段含有MDN1基因起始密码子上游1 kb基因组序列, 3×FLAG标签(tag)(DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGGSG GS)编码序列, 以及下游1 kb基因组序列的供体序列, 连接在pUC57载体, 作为CRISPR/Cas9系统修复供体质粒。

1.2.3 FLAG-MDN1细胞株构建 将CRISPR/Cas9系统的sgRNA表达质粒和修复供体质粒同时转染Expi293F细胞, 采用DMEM(10% FBS)培养, 48 h后进行流式分选, 将mCherry阳性细胞单克隆分选至96孔板。对存活细胞进行传代培养。存活细胞培养至一定数量后, 抽提基因组进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)验证(MDN1-FLAG-for, CTC GGG GTG AGG GCC CTG GGT CGC CAC CAT GGA CTA CAA GGA CCA CGA CGG; MDN1-donor-rev, ACT CAC CTG TCC CGT GGC TCA CG); 全细胞裂解液用FLAG抗体进行蛋白质印迹法(Western blotting)验证。阳性细胞扩大培养至悬浮状态, 悬浮细胞在无血清悬浮培养基, 37℃、5% CO₂、140 rpm条件下培养。在细胞密度约为3×10⁶/mL的条件下收取, 后进行蛋白质纯化。

1.2.4 免疫荧光(immunofluorescence, IF)鉴定 提前24 h将细胞培养在玻片上。将培养基吸掉, 用4%多聚甲醛室温固定20 min, PBST(PBS+0.5% 聚乙二醇辛基醚, TritonX-100)处理15 min, 封闭液(5% BSA+PBS+0.1% TritonX-100)封闭30 min, 加FLAG一抗4℃孵育过夜。用PBST洗3次, 加荧光二抗, 室温孵育40 min。之后用PBST洗3次, 加DAPI室温染色5 min, 封

片。之后在共聚焦显微镜上观察。

1.2.5 MDN1 蛋白质纯化 表达目的蛋白质的 Expi293F 细胞用 $1\ 000\times g$ 离心 20 min, 弃上清, 用裂解缓冲液 (50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl、400 mmol/L NaCl、1 mmol/L $MgCl_2$ 、10% Glycerol、1 mmol/L DTT、cocktail) 重悬, 采用液氮冻存法冻存细胞, 液氮研磨法裂解细胞。细胞裂解后经 $39\ 190\times g$ 离心 50 min, 取上清与 ANTI-FLAG[®] M2 Agarose Affinity Gel 在 4 ℃ 低速旋转混合 4 h, Gel 用洗涤缓冲液 (50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl、400 mmol/L NaCl、1 mmol/L $MgCl_2$ 、10% Glycerol、1 mmol/L DTT) 洗去杂蛋白质, 再用含 200 ng/ μ L FLAG Peptide 的洗脱缓冲液 (50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl、120 mmol/L NaCl、1 mmol/L $MgCl_2$ 、1 mmol/L DTT) 洗脱目的蛋白质。将蛋白质样品用 100 kD 浓缩管浓缩至 200 μ L, 通过 10%~30% 甘油密度梯度离心法, 用 SW60 转子, $184\ 500\times g$, 4 ℃, 14 h 分离纯化目的蛋白质。结束后每 200 μ L 收集, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析鉴定目的蛋白质。

1.2.6 蛋白质组分的质谱鉴定 由于许多样品中加有去污剂, 需要事先沉淀洗涤处理之后才能上机。样品的处理方法步骤如下: 首先沉淀样品去除样品中去污剂如 TritonX-100, 乙基苯基聚乙二醇 (Nonidet P 40, NP40), 十二烷基-beta-D-麦芽糖苷 (N-Dodecyl- β -D-maltoside, DDM) 等。之后重新溶解样品, 还原烷基化, 用胰蛋白酶, 37 ℃ 酶解过夜。最后对酶解溶液进行脱盐处理, 通过液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 进行分析; 质谱原始数据提交到 Proteome Discoverer 2.3 软件中, 使用 UniProt 数据库中的 (Homo sapiens) 蛋白质数据库进行检索。

1.2.7 负染样品制备、数据收集及模型构建 因甲酸双氧钨 (uranyl formate, UF) 溶液渗透能力较强并且颗粒非常细腻, 故选择其作为样品的负染色液。负染电镜实验步骤如下: 对碳膜铜网进行亲水化处理后, 取 3 μ L 蛋白质溶液滴于碳膜铜网, 吸附 1 min; 用滤纸从碳膜铜网边缘轻轻吸去多余的溶液, 滴加 10 μ L UF 负染色液 ($\rho=0.75\%$), 洗 2 次, 染色 1 min; 用滤纸吸去多余液体, 室温晾干; 晾干后将样品置于 120 kV 透射电镜中观察, 放大倍数设置为 57 000 倍, 欠焦值设置为 $-1\sim-2\ \mu$ m; 选择样品颗粒分散性和均一性较好的区域进行数据收集。随后利用数据处理软件 EMAN2^[29] 和 RELION^[30] 对所收集的图像进行处理并产生一个三维模型。

1.2.8 MDN1 蛋白质结构预测 I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) 是由密歇根大学开发的

在线蛋白质结构与功能预测的工具^[31], 预测的原理是不相似的氨基酸序列也可以对应着相似的蛋白质结构。它能从 PDB (Protein Data Bank) 数据库里识别结构模板, 通过基于迭代模板的片段组装模拟来构建完整的结构模型。接着通过蛋白质功能数据库 BioLiP 对 3D 模型重新线程化, 从而预测靶标的功能。由于 MDN1 蛋白质较大, 只对其 6 个 AAA 结构域预测, 获得相应的蛋白质三级结构预测数据。

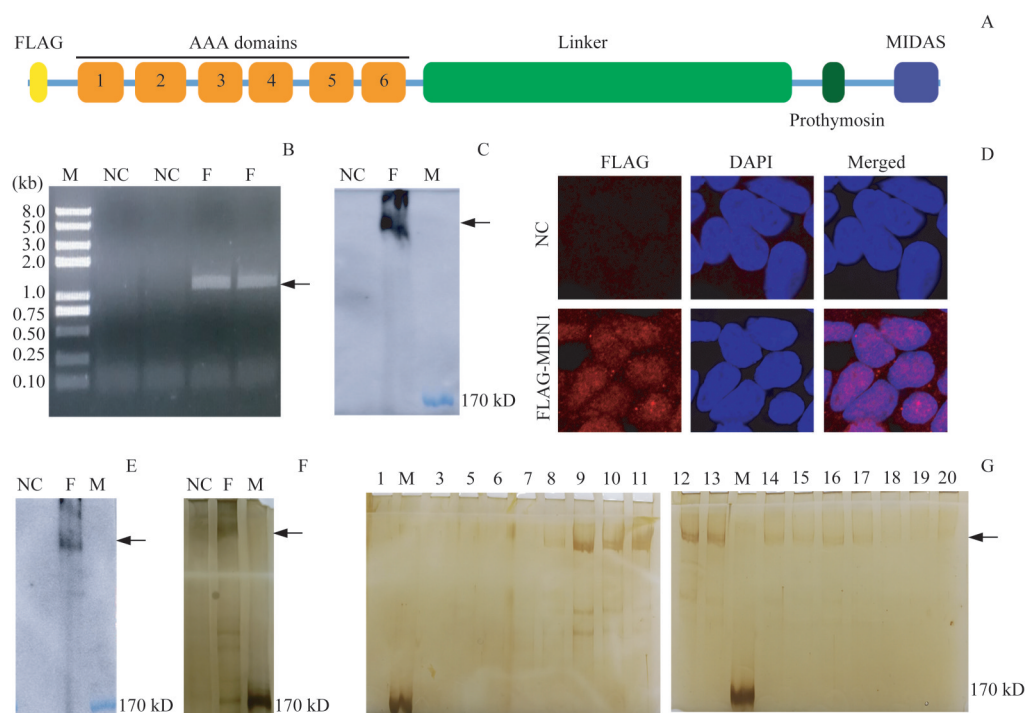
2 结果

2.1 构建内源表达 FLAG-MDN1 的细胞株

人源 MDN1 全长包含 5 596 个氨基酸残基, 分子量较大, 进行克隆和外源表达的难度非常高, 因此我们采用对 Expi293F 细胞内源敲入标签的方法进行内源表达。在 MDN1 蛋白质的 N 端敲入 FLAG 标签, 用于亲和层析 (图 1A)。通过 CRISPR/Cas9 对 Expi293F 细胞 MDN1 基因组 N 端进行定点剪切, 再通过带有 FLAG 标签的修复供体进行修复, 然后利用流式细胞术分选 mCherry 阳性的单克隆 Expi293F 细胞进行培养。获得的单克隆细胞株抽提基因组 DNA 进行 PCR 验证, 部分的细胞株样品能够获得预期的特异性 PCR 产物, 说明相应的细胞株已经敲入目的 FLAG 标签 (图 1B)。进一步, 利用 FLAG 抗体对全细胞裂解液进行 Western blotting 分析, 结果显示阳性克隆细胞株能够检测到目的条带 (图 1C), 表明带有 N 端 FLAG 标签的 MDN1 蛋白质可以正确表达。另外我们也采用 IF 技术, 检测 FLAG-MDN1 的表达和定位 (图 1D)。上述 3 种不同的检测方法, 都证实 FLAG 纯化标签在 MDN1 蛋白质 N 端成功敲入, 获得正常表达 FLAG-MDN1 融合蛋白质的 Expi293F 细胞株。

2.2 MDN1 蛋白质的纯化

对标签敲入成功的阳性细胞株进行扩大悬浮培养, 收取 6 L 细胞 (约 1.8×10^{10} 个细胞) 用裂解缓冲液重悬后, 采用液氮研磨法破碎细胞。细胞裂解后经高速离心取上清, 利用 ANTI-FLAG 亲和层析方法获得目的蛋白质。纯化富集的蛋白质样品采用 Western blotting 和银染的方法进行检测 (图 1E、F), 证实得到的样品主要包含目的蛋白质 FLAG-MDN1。将纯化样品采用体积分数为 10%~30% 的甘油通过密度梯度离心法进行分离纯化, 进一步提高样品的纯度和均一性; 密度梯度离心获得的样品按 200 μ L/管进行组分收集, 通过 SDS-PAGE 和银染鉴定不同的收集组分, 选取纯度和均一性较好的样品用于后续的实验 (图 1G, 孔道 9~11)。



Note: A. Schematic representation of MDN1 domain organization. FLAG tag was inserted into the N-terminus of MDN1. B/C. Verification of the knock-in of FLAG tag by PCR (B) and Western blotting (C). NC—negative control; F—FLAG tag knock-in cell lines. The arrow indicates expected PCR products or protein bands. D. IF detection of endogenous FLAG-tagged MDN1 protein. E/F. Western blotting analysis and silver staining of purified FLAG-MDN1. G. Silver staining of protein fractions after density gradient centrifugation. 1–20—protein fractions.

图1 人源内源FLAG-MDN1蛋白质纯化

Fig 1 Purification of the human endogenous FLAG-tagged MDN1 protein

2.3 MDN1蛋白质负染电镜数据收集和三维模型的构建

在获得高纯度且均一性较好的MDN1蛋白质样品后,采用负染色电镜技术和单颗粒重构技术分析目的蛋白质的三维模型。对碳膜铜网进行亲水化后,将样品吸附到碳膜铜网,经重金属甲酸双氧铀(UF)染色,通过120 kV透射电镜观察,结果表明样品在负染条件下蛋白质浓度合适,颗粒分散性和均一性较好(图2A)。大部分颗粒的形状为长条形,长度约29 nm,和预期分子量大小基本相符(图2A)。部分颗粒的形状偏向圆形,可能是MDN1蛋白质6个AAA结构域的投影。我们在57 000放大倍数条件下共收集负染照片103张,运用EMAN2软件手动挑选颗粒,共挑出16 103个颗粒,之后使用RELION软件进行二维分类平均(2D classification)(图2B)和三维分类(3D classification)计算。结果表明MDN1蛋白质结构特征明显(图2C),用于三维重构的颗粒角度分布均匀(图2D)。

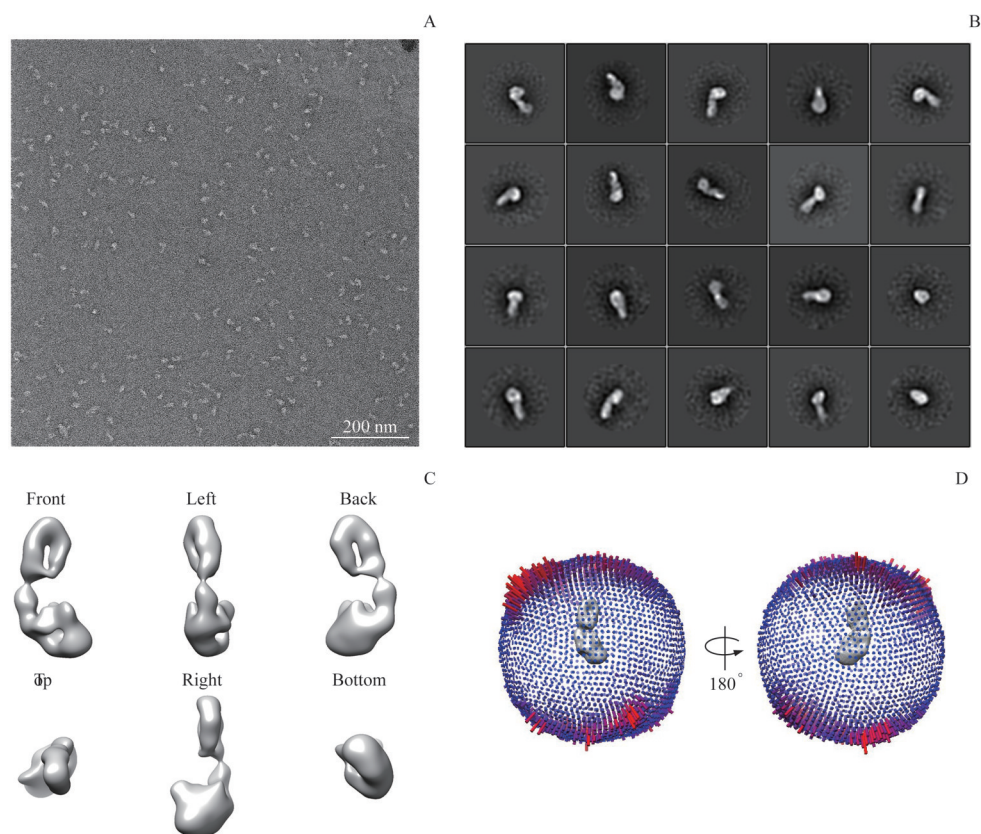
2.4 MDN1蛋白质初步结构分析

负染数据进一步经过三维优化处理(3D auto-Refine),最终获得分辨率约为45 Å的人源MDN1蛋白质负染三维结构模型(图3A)。整个蛋白质大小为140 Å×170 Å×340 Å(图3B),其整体轮廓和已报道的酵母源的MDN1蛋白质较为相似^[24]。已有的研究预测MDN1蛋白

质含有6个AAA结构域(图1A)^[10],借助I-TASSER软件对该结构域进行模拟,结果如图所示(图3C);进一步对模拟结果通过UCSF Chimera^[32]自动匹配,大致确定了AAA结构域在MDN1蛋白质负染结构模型中的位置(图3D)。将我们的负染三维模型和已报道的酵母源MDN1的蛋白质结构进行比较,发现二者的AAA结构域在整体结构中的定位是类似的(图3D)^[24]。这进一步表明MDN1蛋白质结构在酵母和人之间是较为保守的。

3 讨论

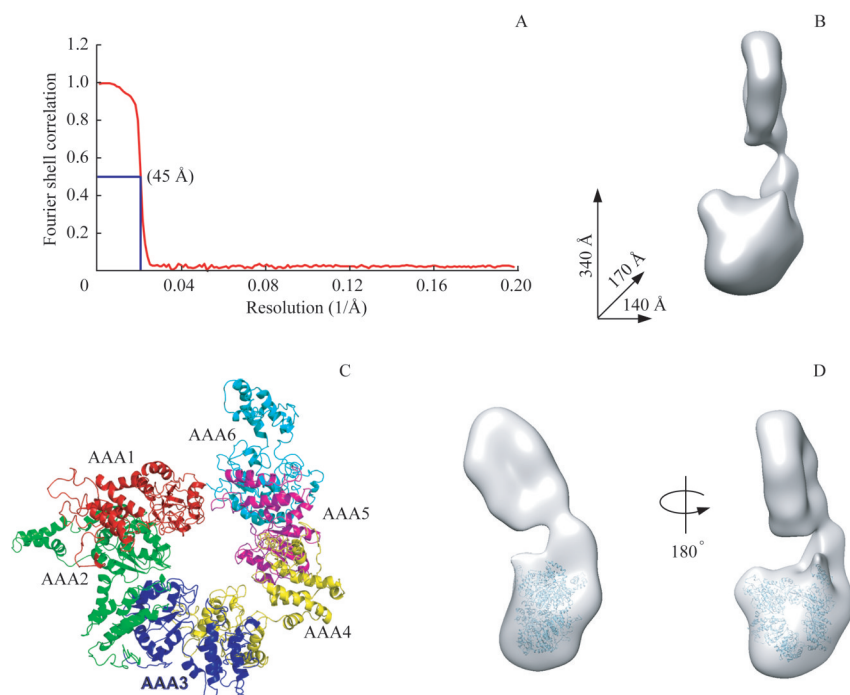
由于核糖体在细胞中的重要性,其装配成熟过程一直是相关研究领域的一个热点问题。已有的研究表明,AAA-ATPase在pre-60S核糖体成熟和出核过程中发挥着重要作用^[10]。尽管MDN1功能有一些研究报道,也有研究者在2018年发表了酵母源MDN1的高分辨率结构^[24-25],但是人源MDN1的结构研究进展缓慢,目前尚无任何高分辨率结构的报道,这限制了研究人员对MDN1在哺乳动物pre-60S核糖体成熟过程中发挥作用的分子机制的理解。虽然氨基酸序列分析表明酵母源与人源MDN1蛋白质在某些结构域有一定的保守性,但有研究认为人源MDN1在pre-60S核糖体成熟过程中被招募的机制可能有所不同,与其



Note: A. A representative negative-staining electron micrograph image of MDN1. B. Selected reference-free 2D class averages. C. Reconstruction of MDN1 protein shown in six orthogonal views as indicated. D. Angular distribution of the particles used for the final reconstruction.

图2 负染电镜分析 MDN1 蛋白质

Fig 2 Negative-staining electron microscopy analysis of MDN1



Note: A. Gold standard Fourier shell correlation (FSC) curve of the final reconstructed electron micrograph map of MDN1. B. Surface view of the electron micrograph map of MDN1 and its volume size. C. Predicted atomic model of MDN1 AAA domains (amino acids—307-2313). D. Docking of the predicted atomic model of AAA domains into corresponding mass of MDN1 shown in two orthogonal views.

图3 MDN1 蛋白质三维模型和 AAA 结构域的定位

Fig 3 Three-dimensional reconstruction of MDN1 and localization of AAA domains

相互作用的核糖体组装因子也有所差异,例如在人源细胞中MDN1能够被SUMO化的proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 (PELP1)招募至pre-60S核糖体^[20]。因此,解析人源MDN1蛋白质结构对于阐明哺乳动物MDN1的具体功能和相关机制有重要的意义。

MDN1蛋白质分子量非常巨大,外源表达有一定的难度,并且整体结构也不适合采用晶体结构生物学方法进行解析,所以我们在Expi293F细胞的MDN1蛋白质的N端敲入亲和纯化标签FLAG,通过亲和层析获得少量的纯化样品进行电镜结构解析。通过负染色技术和单颗粒重构技术(single-particle),获得了MDN1蛋白质低分辨率三维结构。从整体轮廓看,MDN1的结构在人源细胞和酵母内是较为保守的。另外,我们也利用结构预测和分子对接的方法,初步确定人源MDN1的AAA结构域在整体结构中的定位。

MDN1属于AAA-ATPase家族成员,该家族蛋白质包含至少一个结构上非常保守的AAA结构域,再组装为功能活跃的环状结构。不同于其他寡聚化的AAA-ATPase复合物,MDN1蛋白质氨基酸序列包含有6个AAA结构域,能够通过自身的肽链折叠,形成相应的环状结构。事实上,我们的负染结构模型也表明人源MDN1是以单体的形式存在,并且有类似的AAA环状结构,这和酵母源的MDN1是一致的。为了得到人源MDN1高分辨率的结构,下一步我们将着重提高MDN1的纯化产量,尝试冷冻电镜分析。由于采用Expi293F内源表达的方法,获得的MDN1纯化样品相对较少,6 L细胞得到的目的蛋白量为100~120 μg ,我们将通过扩大细胞培养量,解决这个蛋白质产量限制问题,以期获得MDN1蛋白质的冷冻电镜高分辨结构,阐明MDN1在pre-60S核糖体成熟中发挥作用的结构基础。

参·考·文·献

- [1] Kressler D, Hurt E, Bergler H, et al. The power of AAA-ATPases on the road of pre-60S ribosome maturation: molecular machines that strip pre-ribosomal particles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(1): 92-100.
- [2] Woolford JL, Baserga SJ. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2013, 195(3): 643-681.
- [3] Kater L, Thoms M, Barrio-Garcia C, et al. Visualizing the assembly pathway of nucleolar pre-60S ribosomes[J]. *Cell*, 2017, 171(7): 1599-1610. e14.
- [4] Venturi G, Montanaro L. How altered ribosome production can cause or contribute to human disease: the spectrum of ribosomopathies[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2300.
- [5] Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction[J]. *Blood*, 2010, 115(16): 3196-3205.
- [6] Pelava A, Schneider C, Watkins NJ. The importance of ribosome production, and the 5S RNP-MDM2 pathway, in health and disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(4): 1086-1090.
- [7] Konikkat S, Woolford JL. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast[J]. *Biochem J*, 2017, 474(2): 195-214.
- [8] Patel S, Latterich M. The AAA team: related ATPases with diverse functions[J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(2): 65-71.
- [9] Hanson PI, Whiteheart SW. AAA+ proteins: have engine, will work[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(7): 519-529.
- [10] Prattes M, Lo YH, Bergler H, Stanley RE. Shaping the nascent ribosome: AAA-ATPases in eukaryotic ribosome biogenesis[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 715.
- [11] Wendler P, Ciniawsky S, Kock M, Kube S. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(1): 2-14.
- [12] Gadal O, Strauss D, Braspenning J, et al. A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits[J]. *EMBO J*, 2001, 20(14): 3695-3704.
- [13] Lo YH, Sobhany M, Hsu AL, et al. Cryo-EM structure of the essential ribosome assembly AAA-ATPase Rix7[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 513.
- [14] Pertschy B, Saveanu C, Zisser G, et al. Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(19): 6581-6592.
- [15] Pertschy B, Zisser G, Schein H, et al. Diazaborine treatment of yeast cells inhibits maturation of the 60S ribosomal subunit[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(14): 6476-6487.
- [16] Miles TD, Jakovljevic J, Horsey EW, et al. Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(23): 10419-10432.
- [17] Galani K, Nissan TA, Petfalski E, et al. Real1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60S subunits[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(53): 55411-55418.
- [18] Ulbrich C, Diepholz M, Bassler J, et al. Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits[J]. *Cell*, 2009, 138(5): 911-922.
- [19] Li PC, Ma JJ, Zhou XM, et al. *Arabidopsis* MDN1 is involved in the establishment of a normal seed proteome and seed germination[J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1118.
- [20] Finkbeiner E, Haindl M, Raman N, et al. SUMO routes ribosome maturation[J]. *Nucleus*, 2011, 2(6): 527-532.
- [21] Li PC, Li K, Wang J, et al. The AAA-ATPase MIDASIN 1 functions in ribosome biogenesis and is essential for embryo and root development [J]. *Plant Physiol*, 2019, 180(1): 289-304.
- [22] Bassler J, Kallas M, Pertschy B, et al. The AAA-ATPase Real drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly[J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 712-721.
- [23] Nissan TA, Galani K, Maco B, et al. A pre-ribosome with a tadpole-like structure functions in ATP-dependent maturation of 60S subunits[J]. *Mol Cell*, 2004, 15(2): 295-301.
- [24] Chen Z, Suzuki H, Kobayashi Y, et al. Structural insights into Mdn1, an essential AAA protein required for ribosome biogenesis[J]. *Cell*, 2018, 175(3): 822-834. e18.
- [25] Sosnowski P, Urnauvicius L, Boland A, et al. The CryoEM structure of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome maturation factor Real1[J]. *Elife*. 2018, 7: e39163.
- [26] Kawashima SA, Chen Z, Aoi Y, et al. Potent, reversible, and specific chemical inhibitors of eukaryotic ribosome biogenesis[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 512-524.
- [27] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-662.
- [28] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [29] Tang G, Peng L, Baldwin PR, et al. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy[J]. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 38-46.
- [30] Scheres SH. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination[J]. *J Struct Biol*, 2012, 180(3): 519-530.
- [31] Yang JY, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W174-W181.
- [32] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis[J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(13): 1605-1612.

[收稿日期] 2020-12-28

[本文编辑] 张慧俊 徐 敏

