

ХИМИЯ ПРОНИКАЕТ В БИОЛОГИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ: ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИИ РНК

©2013 г. С. БОШИ-МЮЛЛЕР, Ю. МОТОРИН*

*Université de Lorraine, Laboratoire IMoPA, UMR 7365 CNRS-UL,
Nancy, FRANCE*

I. Введение. II. Ферменты, катализирующие модификацию РНК.
III. Ферментативные механизмы модификаций РНК. IV. Заклю-
чение.

I. ВВЕДЕНИЕ

По окончании процесса транскрипции, протекающей с участием РНК-полимераз(ы), большинство первичных РНК транскриптов в клетке проходит дополнительные стадии созревания с образованием функционально-активных РНК. В зависимости от биологического вида, эти стадии включают в себя 5'- и 3'-тримминг, вырезание интронов [1, 2], а также химические модификации исходных нуклеотидов А, U, C и G. Последнее обеспечивается многочисленными специфическими РНК-модифицирующими ферментами. Эти реакции в большинстве случаев включают в себя прямой перенос метильной группы SAM на субстрат, но в ряде случаев реализуются и более сложные механизмы, с участием низкомолекулярных косубстратов (кофакторов), что приводит к образованию модифицированных нуклеотидов с различной химической структурой. Например, SAM является универсальным донором одноуглеродных остатков в различных реакциях метилирования. На настоящий момент в составе РНК различных организмов охарактеризовано более 110 модифицированных нуклеотидов, различающихся по структуре [3]. Большинство из них представлено метилированными нуклеотидами, но

Принятые сокращения: МТаза – метилтрансфераза, SAM – S-аденозил-L-метионин.

**Адрес для корреспонденции:* Ю.Моторин, Laboratoire IMoPA, UMR 7365 CNRS-UL, Faculté de Médecine de Nancy, 9 rue de la forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy, FRANCE; электронная почта: Yuri.Motorin@univ-lorraine.fr

возможны и другие реакции модификации, такие как изомеризация, тиолирование, восстановление и др. В некоторых случаях необходим целый каскад ферментативных реакций для полного синтеза гипермодифицированных нуклеотидов в РНК. Отдельные примеры модифицированных нуклеотидов, обсуждаемых в данном обзоре, приведены на рис. 1.

Модифицированные нуклеотидные остатки обнаружены во всех организмах и многие из них являются высококонсервативными для определенного вида РНК. Наиболее ярким примером такого консерватизма являются так называемые T ψ C- и D-петли, присутствующие почти во всех тРНК. Эти петли содержат высококонсервативные, модифицированные остатки риботимидина (T = m⁵U), псевдоуридина (ψ) и дигидроуридина (D). Имеется множество других проявлений высокой эволюционной консервативности как модифицированных нуклеотидов в РНК, так и соответствующих систем ферментативной модификации РНК, участвующей в биосинтезе этих нуклеотидов.

Во многих работах подчеркнута исключительное значение модифицированных нуклеотидов для фолдинга РНК, образования их вторичной и третичной структуры [4] тепловой и конформационной устойчивости, а также для взаимодействия с другими РНК и белками внутри клетки. Эти аспекты рассмотрены в обзорах [5, 6].

II. РНК-МОДИФИЦИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ. КРАТКИЙ ОБЗОР ПРОЦЕССА МОДИФИКАЦИИ РНК В КЛЕТКЕ

Поскольку все известные модифицированные нуклеотиды, идентифицированные в РНК, образуются в результате ферментативных реакций, к настоящему моменту охарактеризовано несколько классов ферментов, специфически модифицирующих РНК [7]. Наиболее принятой является классификация, основанная на химической природе образующегося нуклеотида и, в некоторых случаях, учитывается природа РНК-субстрата. Наиболее распространенными РНК-модифицирующими ферментами являются РНК-метилтрансферазы (РНК-МТазы) [5] (метилованными являются около 70% всех известных модифицированных остатков в РНК) и РНК-псевдоуридин(ψ)-синтазы. Охарактеризовано также много других РНК-модифицирующих ферментов с описанием биохимических путей биосинтеза уникальных нуклеотидов (для более подробной информации см. базу данных MODOMICS [3]). Однако, несмотря на существенный прогресс в геномной характеристике молекулярных систем

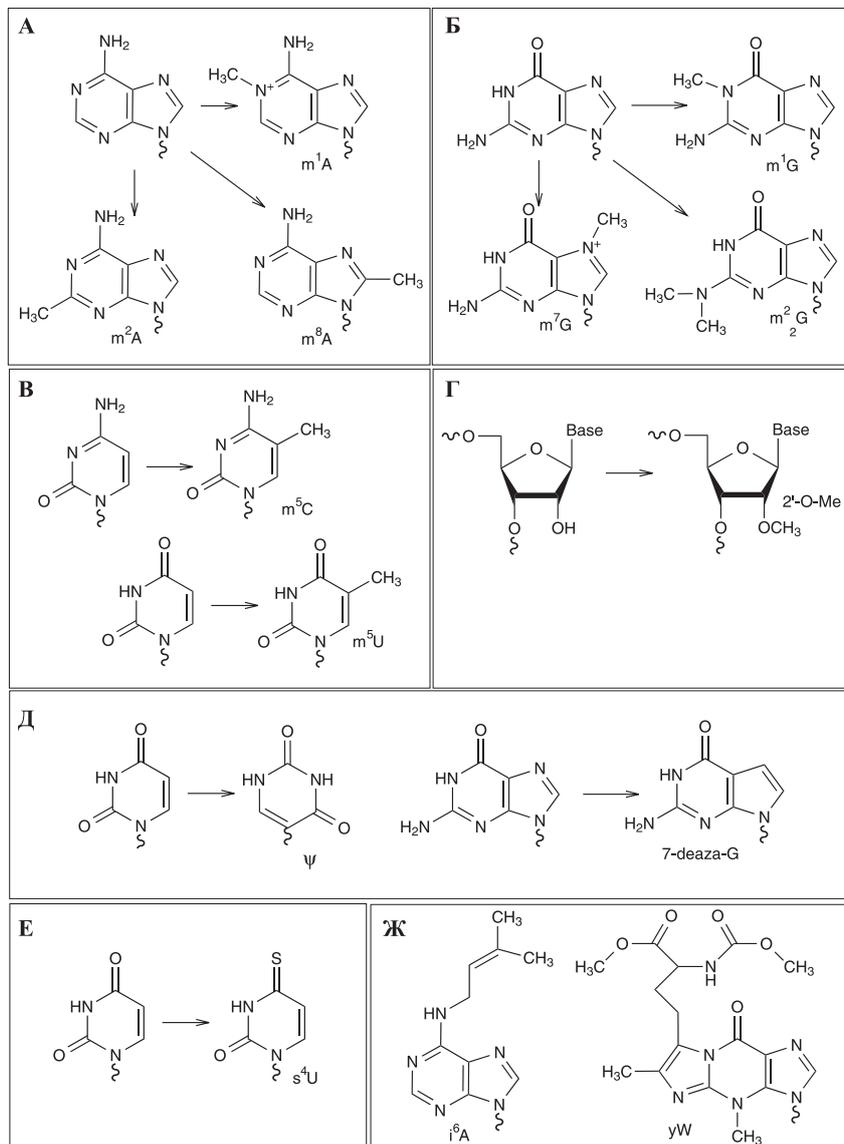


Рис. 1. Химические структуры некоторых модифицированных нуклеотидов.

модификации РНК, точные химические механизмы и кинетические параметры модификации РНК часто остаются не выясненными. В данном обзоре будут детально рассмотрены только несколько основных классов РНК-модифицирующих ферментов, а именно РНК-МТазы, РНК-ψ-синтазы, гуанинтрансгликозилазы TGT и тРНК-тиолазы.

ОСНОВНЫЕ КЛАССЫ РНК-МОДИФИЦИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

РНК-метилтрансферазы

Как было отмечено ранее, РНК-МТазы составляют значительную часть известных РНК-модифицирующих ферментов. Эти ферменты принадлежат к большой группе метилтрансфераз, которые катализируют перенос CH_3 -группы (Me-группы) от донора метильной группы на биомолекулу [8, 9]. В зависимости от характерных элементов первичной и трехмерной структуры, МТазы подразделяются на 5 отдельных классов. Большинство ДНК- и РНК-МТаз принадлежат классам I (наиболее представительный) [8] и IV (в основном, 2'-О-РНК-МТазы SpоU типа и m¹G-тРНК-МТазы) [10, 11]. По кинетическим и физическим параметрам РНК-МТазы сравнимы с другими метилтрансферазами, модифицирующими ДНК, белки и даже малые молекулы [12]. Самым универсальным донором Me-группы в реакциях метилирования во всех живых организмах является S-аденозил-L-метионин (SAM – S-adenosyl-L-methionine или SAM) и только ограниченное число МТаз использует другие доноры Me-групп, такие как, например, N⁵, N¹⁰-метилентетрагидрофолат ($\text{CH}_2\text{N}(4)\text{TГФК}$) [13].

Анализ многочисленных SAM-зависимых МТаз, известных в настоящее время, выявил существование и высокую степень консервативности SAM-связывающих мотивов в белках. Эти мотивы обнаруживаются почти во всех МТазах независимо от их субстратной специфичности и нумеруются I–X. Известно, что некоторые из этих мотивов участвуют в связывании SAM в активном центре фермента, хотя мотивы IV, V и VI принимают участие и непосредственно в каталитической реакции переноса Me-группы [8, 9]. Недавно обнаружен и другой механизм РНК-метилирования. РНК-МТазы, действующие по этому механизму, также используют SAM в качестве источника Me-группы, но принадлежат к так называемому семейству радикальных SAM ферментов. Известно немного радикальных SAM-зависимых МТаз, действующих на РНК, и примерами ферментов, охарактеризованных наилучшим образом, являются m²A- и m⁸A-генерирующие ферменты RlmN и Cfr из антибиотикоустойчивых

бактерий [14–16]. TYW1, еще один РНК-модифицирующий фермент, который не является РНК-МТазой, но, при этом, использующий механизм радикальной SAM реакции, участвует в начальных стадиях биосинтеза гипермодифицированного основания вайбутозина в эукариотических тРНК [17].

Псевдоуридин-синтазы

Семейство РНК-ψ-синтаз. Модифицированный нуклеотид псевдоуридин наиболее часто встречается в составе внутриклеточных РНК и первоначально он даже рассматривался в качестве пятого нуклеотида, входящего в состав РНК. Однако позднее было выявлено его посттранскрипционное происхождение, и теперь псевдоуридин является одним из основных представителей модифицированных нуклеотидов в РНК. За редкими исключениями, псевдоуридин был обнаружен во всех изученных видах РНК, включая тРНК, рРНК, мякРНК, мякРНК и др. Подобно другим модифицированным нуклеотидам, псевдоуридин включается посттранскрипционно и эти превращения осуществляются РНК-ψ-синтазами [18–20].

Все известные РНК-ψ-синтазы подразделяются на 6 отдельных семейств в зависимости от их аминокислотной последовательности и консервативности структуры. Эти семейства получили название по образующим семейство белкам, охарактеризованным в *E. coli* (семейства I–V) или, если они отсутствуют в эубактериях, по белку архей (семейство Pus10). Большое разнообразие среди РНК-ψ-синтаз отражает низкую степень консервативности аминокислотных остатков, участвующих в катализе. Лишь один каталитический остаток (в основном, Asp) сохраняется во всех классах охарактеризованных ферментов. В некоторых случаях он дополняется остатками основных аминокислот – Lys или Arg (см. рис. 2) [21].

TruA	xxxRT D
RluA	xxHRL D
RsuA	xxGRL D
PUS10	xxGRE D
TruB	HxGxL D
TruD	xAGxK D

Рис. 2. Консервативный мотив в семействах РНК-псевдоуридиновых синтаз. Изображены только репрезентативные члены каждого семейства.

Несмотря на значительные различия в размерах, первичной структуре и общей пространственной структуре белков, все эти ферменты катализируют одну и ту же химическую реакцию (изомеризацию включенного в РНК остатка U во псевдоуридин). Хотя продукт реакции один и тот же, РНК, выступающие в качестве субстрата для этого класса РНК-модифицирующих ферментов, значительно различаются между собой по размеру и трехмерной структуре. Многие РНК-ψ-синтазы специфически распознают тРНК, в то время как другие взаимодействуют с мяРНК, рРНК, др. В некоторых случаях один и тот же фермент проявляет активность как в отношении тРНК, так и других РНК, поскольку фермент узнает только ограниченный структурный домен [22, 23].

тРНК-гуанинтрансгликозилазы

Реакция, катализируемая тРНК-гуанинтрансгликозилазами (TGT) была случайно обнаружена в экспериментах по включению радиоактивно меченого основания (G) во фракцию тРНК при инкубации с бесклеточным экстрактом. Понимание биологического значения этого феномена пришло значительно позже, когда деаза-производные гуанозина (модифицированные нуклеотиды семейства квеозина) были обнаружены в антикодоновой петле молекул тРНК, как бактериального происхождения, так и у высших эукариот. Действительно, ферменты семейства TGT катализируют замену исходно включенного остатка G на деазагуанозиновое основание, которое синтезируется независимо. Это инкорпорированное основание квеозин Q (или пре-квеозин, preQ₁) далее модифицируется с образованием Q, ManQ или GalQ [3]. Очень похожая реакция была также обнаружена у архей, у которых обмениваемый остаток архэозина находится в положении 15 в D-петле, за исключением того, что остаток G заменяется на preQ₀ и далее превращается в архэозин.

Чтобы осуществить замену оснований, TGT-ферменты сначала осуществляют расщепление C–N гликозидной связи (как это делают РНК-ψ-синтазы) с последующим образованием реакционноспособного промежуточного соединения – ковалентно связанного комплекса РНК–фермент. Этот реакционноспособный интермедиат далее используется для включения деазагуанозинового производного.

Кристаллическая структура TGT из *Z. mobilis* в комплексе с миниспиралью РНК-субстрата показала существование ковалентного промежуточного продукта соединения, содержащего каталитически-важный остаток Asp, ковалентно связанный с атомом углерода C¹¹ в рибозильном остатке заменяемого G нуклеотида [24–27].

тРНК тиолазы

Биосинтез тиолированных нуклеотидов в тРНК катализируется сульфотрансферазами, ответственными за s^2U , s^4U , s^2C и также ms^2A и его производных. Эти тиолированные нуклеотиды имеют важное значение в декодировании мРНК и также обеспечивают фоточувствительность бактерий к УФ свету [28]. Наиболее хорошо изученной тРНК-сульфуртрансферазой является фермент ThiI, ответственный за образование s^4U в 8-ом положении в тРНК [29, 30]. Напротив, ферменты (метилтиотрансферазы – МТГазы), ответственные за образование ms^2 -группы (тиометильной), принадлежат к семейству радикальных SAM ферментов [31].

Другие ферменты

Приведенные выше примеры свидетельствуют о разнообразии каталитических механизмов, выработанных природой для модификации РНК. Однако некоторые основные принципы характерны для всех типов реакций. Например, остаток Cys необходим для активации основания U при синтезе $smnm^5U$ [32–34], в то время как метилирование экзоциклической NH_2 -группы, при синтезе i^6A происходит аналогично метилированию NH_2 -группы [35]. Как было отмечено выше, белок TYW1, содержащий Fe–S кластер, участвует в биосинтезе вайбутозина в радикальной реакции с участием SAM через циклический интермедиат imG-14, образующийся из m^1G в положении 37 в антикодоновой петле тРНК [17]. Каталитические механизмы многих других РНК-модифицирующих ферментов все еще остаются подробно не изученными.

Основные стадии процесса РНК-модификации

Независимо от химической структуры модифицируемого нуклеотида, на молекулярном уровне весь ферментативный процесс модификации РНК может быть условно разделен, по крайней мере, на четыре элементарные стадии:

- (1) связывание РНК-субстрата и кофактора (ко-субстрата),
- (2) конформационные изменения РНК и белка, обеспечивающие связывание модифицируемого нуклеотида в каталитическом центре фермента,
- (3) химическая модификация нуклеотида,
- (4) высвобождение продукта.

На каждой из стадий аминокислотные остатки фермента вступают во взаимодействие с полинуклеотидной цепью РНК посредством

водородных связей, а также электростатических и Ван дер Ваальсовых взаимодействий. Известно, что электростатические взаимодействия между отрицательно заряженными фосфатными остатками РНК и положительно заряженными остатками Lys и Arg в составе белка стабилизируют переходный комплекс и благоприятствуют последующим конформационным изменениям как в РНК, так и в ферменте. Во время этой взаимной адаптации макромолекул, основание, служащее в качестве мишени, часто стабилизируется в активном центре благодаря стэкинг-взаимодействию с остатками Phe или Tyr. Во время каталитической стадии реакции, аминокислотные остатки активного центра фермента индуцируют изменение электронной плотности в нуклеиновом основании, осуществляя активацию определенного атома или группы для последующей модификации. На последней стадии происходит диссоциация модифицированной РНК из E-S комплекса, что может быть лимитирующей стадией всего процесса.

Стабилизация РНК-субстрата

Взаимодействие между РНК-модифицирующим ферментом и его РНК-субстратом происходит за счет множественных точечных контактов, необходимых для эффективного связывания субстрата и его химической модификации. Эти взаимодействия могут быть неспецифичными (например, сильные электростатические взаимодействия с фосфатными группами РНК) и специфическими, что позволяет осуществить точное распознавание последовательности РНК. Эти специфические взаимодействия, в основном, осуществляются за счет контактов между основаниями и полярными аминокислотами в активном центре путем образования водородных связей. Как уже было отмечено выше, основание-мишень правильно фиксируется в активном центре фермента благодаря конформационным изменениям в РНК и стабилизируется через стэкинг-взаимодействия с соответствующей ароматической аминокислотой, что вносит свой вклад в реакционную способность основания на каталитической стадии.

III. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИИ РНК

В этой главе будут рассмотрены только хорошо исследованные химические механизмы модификации и ферменты, катализирующие эти процессы. Эти механизмы были установлены для большинства процессов в течение последнего десятилетия благодаря направленному мутагенезу и рентгеноструктурным исследованиям, которые достаточно

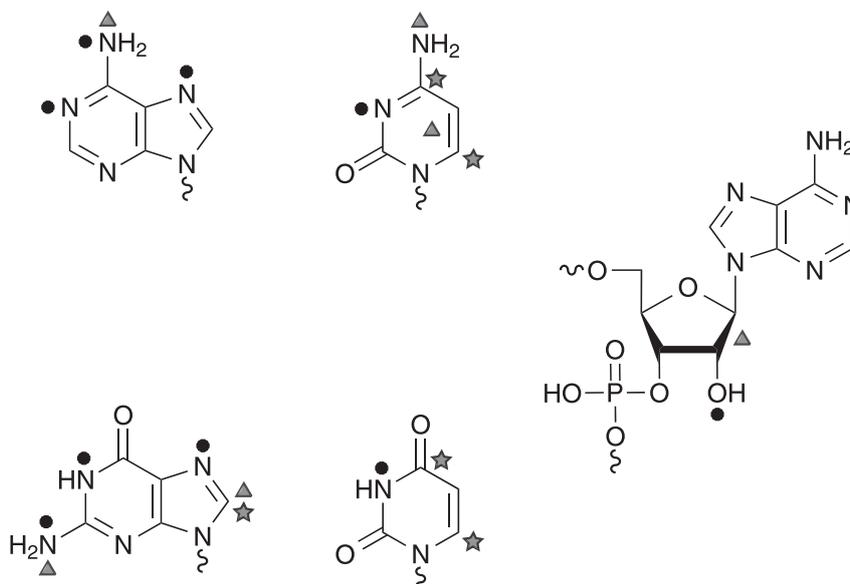


Рис. 3. Реакционная способность нуклеотидов.

Представлены только высоко реакционноспособные центры, подтвержденные с помощью химических реагентов. Нуклеофильные центры показаны черными кружочками, электрофильные – звездочками и центры, подверженные действию окислителей – треугольниками.

хорошо описаны и не будут рассмотрены в данной работе (для примера см. [36–41]).

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕОТИДОВ В СОСТАВЕ РНК

Первичный транскрипт РНК состоит только из немодифицированных нуклеотидов А, С, G и U. Фосфатные остатки в молекулах РНК не подвергаются ферментативной модификации, хотя это можно осуществить при помощи сильных алкилирующих реагентов. Рибоза в составе РНК модифицируется только по 2'-ОН группе, а подавляющее большинство реакций РНК-модификации затрагивает различные атомы (С, N и O) в азотистых основаниях (см. рис. 3). В зависимости от природы азотистого основания, относительная реакционная способность различных циклических и экзоциклических групп может варьировать, однако некоторые реакции являются общими как для пиримидиновых (С и U), так и для пуриновых (А и G) оснований. Например, связь $C^5=C^6$ в пиримидиновых основа-

ниях весьма реакционноспособна и достаточно легко вступает в реакции нуклеофильного присоединения, а атом N⁷ в А и G легко алкилируется [42].

Атомы углерода в 6-ом положении пиримидинового кольца являются весьма реакционноспособными из-за смещения электронной плотности в направлении карбонильных групп в 4-ом положении U или во 2-ом положении C. Соответственно, бисульфит, а также производные гидразина и гидроксиламина реагируют с U и C с образованием дигидропиримидиновых производных. Напротив, атом углерода C⁵ реагирует с электрофилами, такими как Br₂, ICl (реакции галогенирования) или Hg(OAc)₂ [42].

Атомы азота в азотистых основаниях (N³ в пиримидинах, N¹ и N⁷ в пуринах) являются мишенями для химических реакций алкилирования электрофильными агентами или для реакций с соединениями с активированной C=C связью (карбодиимиды, акрилонитрил).

Реакционная способность экзоциклических аминогрупп А и С близка таковой для ароматических аминов и эти аминогруппы легко алкилируются, алкилируются, вступают в реакции с альдегидами (формальдегид, глиоксаль) и взаимодействуют с азотистой кислотой.

Еще одной «слабой» точкой в РНК (и ДНК) является N-гликозидная связь между основанием и рибозой (дезоксирибозой). При низких значениях рН N-гликозидные связи быстро расщепляются благодаря протонированию основания по N³ (в пиримидинах) и N⁷ в пуринах [42]. Многие из этих реакционноспособных атомов являются мишенями для ферментативной модификации молекул РНК.

МЕХАНИЗМ РНК-МЕТИЛИРОВАНИЯ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗАМИ

Все РНК-МТазы осуществляют прямой или опосредованный перенос метильной группы на субстрат, что приводит к С-, О- или N-метилованному производному. В подавляющем большинстве случаев донором метильной группы служит S-аденозил-L-метионина

Рис. 4. Предполагаемые механизмы реакций N- и O-метилирования. →

А) N-метилирование гуанина, катализируемое ферментом Tgm5 (адаптировано из [43]). Депротонирование гуанина происходит при помощи остатка Glu, что приводит к сдвигу электронной плотности к O⁶, стабилизированному остатком аргинина. Последующая нуклеофильная атака SAM депротонированным N¹ атомом приводит к образованию продукта.

Б) Химическая структура SAM и его схематическое представление.

В) Схематическая диаграмма активного центра мРНК N⁷-МТазы вируса оспы (адаптировано из [45]) с предполагаемыми взаимодействиями SAM и кэпа (ГТФ)

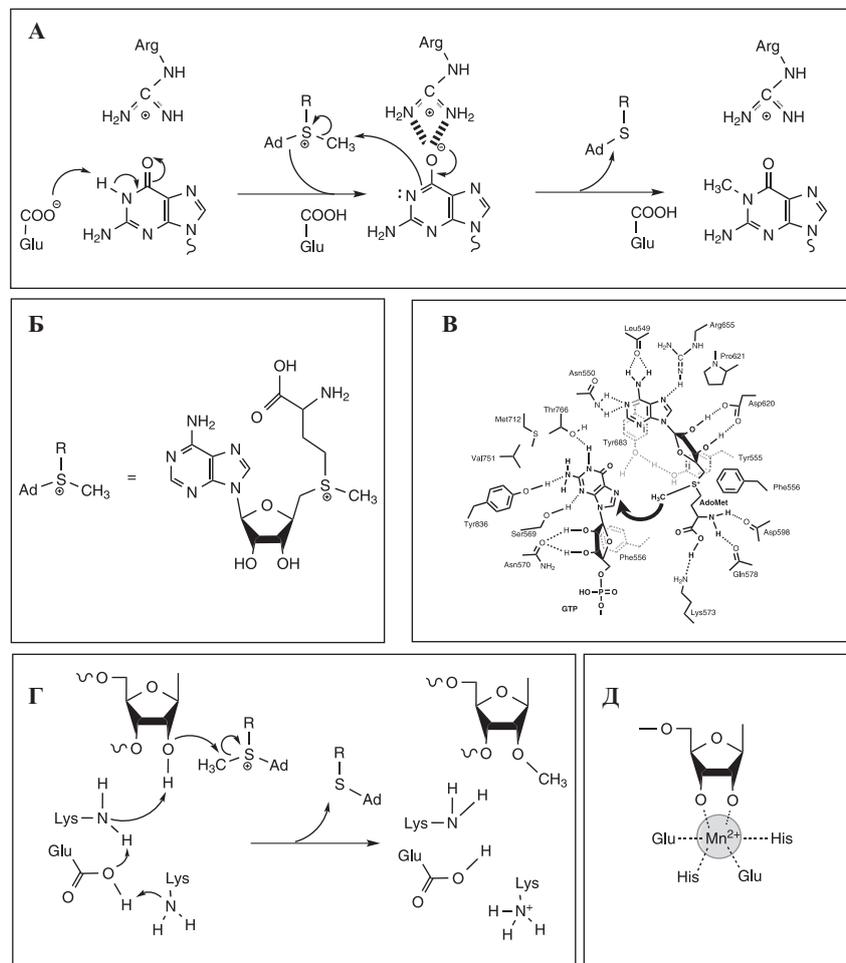


Рис. 4. Окончание подписи к рис., начало – см. стр.44.

во время реакции переноса метильной группы. Пунктирные линии обозначают потенциальные водородные связи. Tyr555 и Phe556 находятся в N-концевом пептиде.

Г) 2'-O-метилование: предполагаемый механизм действия фермента nsp10 (адаптировано из [47]). ε-Аминогруппа остатка Lys, депротонированного согласованным действием остатков Glu и Lys, активирует 2'-ОН группу, которая, в свою очередь, может атаковать электрофильную метильную группу SAM.

Д) Строение комплекса, образованного ионом металла, скоординированного двумя гидроксильными группами субстрата и боковыми цепями четырех аминокислот в активном центре Hen1 (адаптировано из [51]).

(SAM) (рис. 4, Б) и реакция происходит по SN_2 -механизму – атака РНК-субстрата электрофильной метильной группой SAM с одновременным высвобождением S-аденозил-L-гомоцистеина (SAH). Существует большое разнообразие механизмов активации каталитического нуклеофильного атома, в зависимости от его химических свойств. С одной стороны, в связи с присущим им нуклеофильным характером, метилирование по N- и O-атомам происходит путем прямого переноса метильной группы, что может потребовать удаления протона до, одновременно или после переноса метильной группы. Ключевым моментом для механизма переноса метильной группы является также конформация SAM, который обязательно подразумевает точное взаимное расположение электрофильной метильной группы относительно нуклеофильного атома-мишени. С другой стороны, атомы углерода в sp^2 -гибридизации проявляют скорее электрофильный, чем нуклеофильный характер, предотвращая механизм прямого переноса при C-метилировании. В этих случаях, были выработаны две стратегии: реакция переноса двух электронов посредством двухэтапного механизма с образованием ковалентного промежуточного продукта фермент-РНК и механизм одноэлектронного переноса, включающий промежуточное метилирование остатка цистеина.

СТРАТЕГИИ КАТАЛИЗА

Несколько примеров, приведенных ниже, освещают огромное разнообразие каталитических сценариев.

N-метилирование

Хотя механизм N-метилирования выглядит универсальным, тем не менее, эта реакция, по-видимому, не может быть описана с использованием единственной модели. Действительно, химический механизм, предполагает алкилирование атома азота по SN_2 -механизму через промежуточное пентакоординационное состояние метильной группы, в котором уходящая группа (SAH) занимает апикальное положение. Катализ может включать в себя различные стадии, не обязательно независимые друг от друга: сближение с субстратом, его ориентация, стабилизация переходного состояния, диссоциация комплекса продукта реакции с ферментом.

Одним из наиболее хорошо изученных является механизм фермента Trm5, осуществляющего метилирование атома N^1 в молекуле гуанина. С помощью точечного мутагенеза и кинетических

методов было показано, что остатку Glu активного центра отводится важная роль в катализе, возможно как сопряженному основанию. Другой ключевой остаток, Arg, также располагается в активном центре фермента и, предположительно, стабилизирует оксианион на кислороде в шестом положении G (рис. 4А) [43].

N-МТазы также могут модифицировать N⁷ атом гуанина. В этих случаях, отрыв протона не предшествует метилированию и, следовательно, этот механизм катализа отличается от рассмотренного выше. Действительно, в работах с применением точечного мутагенеза фермента вируса оспы, катализирующего образования кэпа на мРНК, было предположено, что катализ осуществляется через стабилизацию переходного состояния посредством суммы различных взаимодействий между боковыми цепями аминокислотных остатков N-концевого пептида, специфичного для этих МТаз и субстратами. Эти взаимодействия происходят, в частности, с участием остатков двух ароматических аминокислот (Tyr и Phe), которые обеспечивают богатое электронами окружение вокруг двух катионных центров (N⁷ и Sy) в переходном SN₂ состоянии [44, 45] (рис. 4В).

Кроме того, сходный каталитический механизм, по-видимому, используется ферментом ErmC', осуществляющим метилирование экзоциклической аминогруппы аденина, несмотря на необходимость депротонирования аминогруппы. Действительно, с помощью мутагенеза было показано, что только остаток Tyr, расположенный в активном центре фермента и участвующий в стабилизации азотистого основания, является незаменимым [46].

О-метилирование

В случае О-метилирования катализ, по существу, направлен на облегчение удаления протона из ОН-группы в составе РНК, что является важной стадией этой SN₂ реакции замещения, в которой ключевая роль отводится кислотно-основному катализу, как в случае, например, ферментов nsp10 и VP39. На основании анализа структуры и точечного мутагенеза было сделано предположение о том, что остаток Lys активирует 2'-ОН группу РНК. Предполагается, что ε-аминогруппа лизина активируется через согласованный механизм с участием Glu и Lys (nsp10) или Asp и Arg (VP39). Каталитический механизм nsp10 также предполагает, что остаток Asp участвует в стабилизации переходного состояния посредством электростатических взаимодействий [47, 48] (рис. 4, Г).

Тем не менее, как часто бывает, чтобы достичь специфического 2'-О-метилирования в 3'-концевом нуклеотиде, эволюция пошла другим путем. Этот механизм требует присутствия катиона металла, которым могут быть ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} . Действительно, необходимо, чтобы металл был скоординирован двумя ОН-группами рибозы (2'- и 3'-) в составе субстрата и четырьмя строго консервативными аминокислотными остатками (двумя Glu и двумя His) (рис. 4, Д). Вовлечение 3'-ОН группы в координацию иона металла объясняет специфичность Hcp1 в отношении метилирования только по 3'-концевому нуклеотиду [49–51]. Металлозависимый механизм 2'-О-метилирования нуждается в дальнейшем изучении.

C- метилирование

Метилирование по C^5 атому (основные продукты 5-метилуридин – риботимидин и 5-метилцитозин) происходит через промежуточное образование продукта присоединения нуклеофильной сульфгидрильной группы фермента по шестому положению пиримидинового цикла, что активирует атом C^5 в нуклеотиде, и метилирование завершается переносом метильной группы, донором которой служит SAM. Последующее удаление протона от C^5 приводит к образованию продукта. С точки зрения катализа, эти реакции используют сопряженное основание для облегчения β -элиминирования, и как было показано, в качестве основания выступает карбоксильная группа Glu (для m^5U) или тиолат (остаток Cys) в случае m^5C (рис. 5, А) [36, 52–54].

Следует отметить, что в случае метилирования по C^5 атому с участием TrmFO, донором метильной группы является 5,10-метилентетрагидрофолат, а не SAM. Механизм вполне сходен с таковым с участием SAM и включает в себя: промежуточное образование продукта присоединения тиолата по C^6 атому пиримидинового цикла, что активирует C^5 положение в азотистом основании и кислотно-основной катализ с участием другого остатка Cys, облегчающий β -элиминирование [13, 55].

Наконец, недавно было показано, что метилирование по атомам углерода C^2 и C^8 пуринового кольца катализируется ферментами RlmN и Cfr, использующими радикальные реакции с участием SAM. В обоих случаях, метильная группа переносится по пинг-понг механизму, включающему промежуточное метилирование каталитического остатка Cys. Действительно, каждая реакция требует двух молекул SAM. Первая молекула используется для SN_2 -метилирования остатка Cys, а вторая молекула SAM реагирует с Fe_4-S_4 кластером с образо-

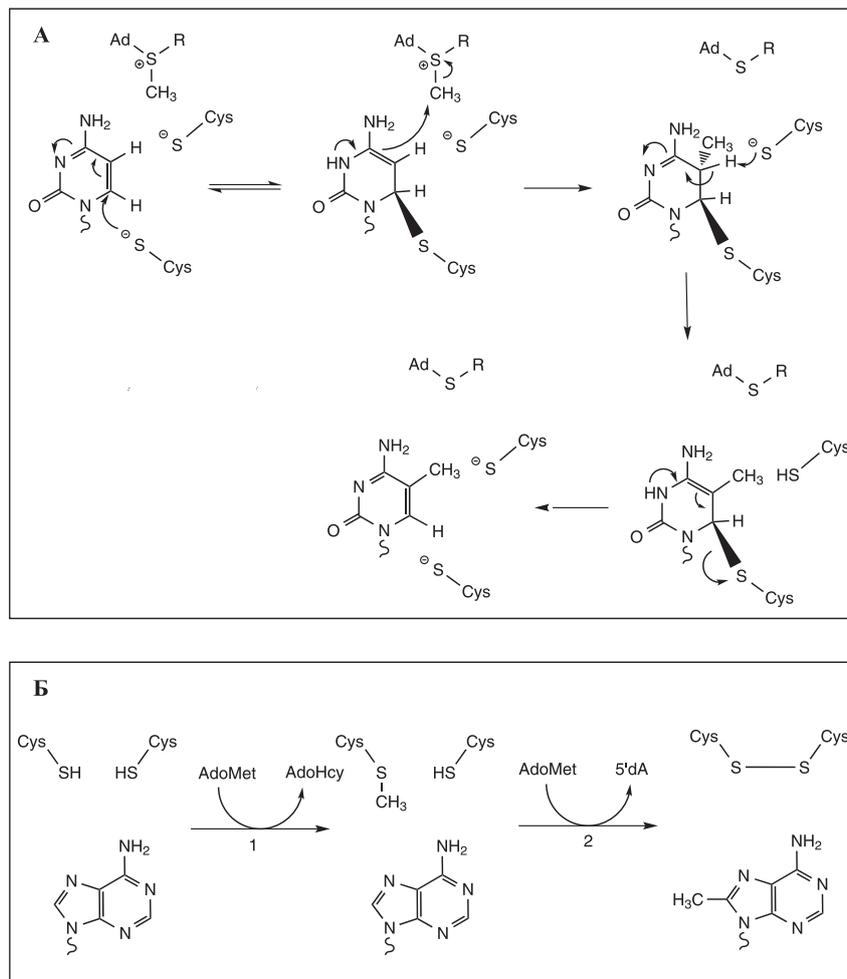


Рис. 5. Предполагаемые механизмы реакций С-метилирования.

А) Механизм образования m^5C (адаптировано из [52]). Реакция включает в себя нуклеофильную атаку C^6 атома цитозина меркаптогруппой каталитического остатка Cys, что приводит к активации C^5 атома нуклеозида, затем происходит перенос метильной группы от SAM и на последней стадии другой остаток Cys катализирует β -элиминирование.

Б) Механизм образования m^8C (адаптировано из [56]). В ходе реакции расходуются два эквивалента SAM, на метилирование каталитического остатка Cys (1 стадия), и на последующее образование 5'-дезоксаденозина (5'dA, 2 стадия).

ванием радикала 5'-дезоксиаденозина. В завершение, 5'-дезоксиаденозин-радикал реагирует с остатком метилтиоцистеина, образуя радикальный промежуточный продукт, что облегчает перенос метильной группы на инертные C⁸ или C² атомы аденина. В результате образуется целевой метилпурин, а Cys превращается в цистин (рис. 5б) [16, 56].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПСЕВДОУРИДИН-СИНТАЗ

Превращение уридина в псевдоуридин катализируется различными семействами РНК-ψ-синтаз, которые используют один и тот же механизм с участием незаменимого остатка Asp в качестве нуклеофила [21, 57]. Этот механизм подразумевает разрыв N-гликозидной связи между кольцом урацила и рибозой, приводящий к образованию ковалентного промежуточного аддукта с остатком Asp, последующий поворот азотистого основания в активном центре фермента и перенос его на рибозу с образованием C–C связи. Однако точный механизм реакции изомеризации до сих пор не выяснен, несмотря на то, что эти ферменты уже идентифицированы и интенсивно изучались на протяжении долгого периода времени. Действительно, до сих пор обсуждаются два альтернативных механизма, значительно отличающихся друг от друга по природе ковалентного промежуточного продукта, образующегося после нуклеофильной атаки каталитической карбоксильной группы [58]. В первом случае, карбоксильная группа атакует C⁶ атом в кольце урацила с образованием ковалентного промежуточного аддукта Михаэля и последующим разрывом гликозидной связи (рис. 6, а). Во втором случае происходит нуклеофильная атака C¹¹ атома

Рис. 6. Предполагаемые механизмы расщепления C–N гликозидной связи. →

А) образование ψ через аддукт Михаэля при нуклеофильной атаке остатка Asp из активного центра на C⁶ атом уридина (адаптировано из [20]). Гликозидная связь разрывается и урацил поворачивается вокруг эфирной связи и формируется новая C–C связь. Затем аспарат удаляется, C⁵ депротонируется и N¹ протонируется.

Б) генерация ψ через образование промежуточного ацилального продукта во время нуклеофильной атаки остатка Asp из активного центра на C¹¹ в U (адаптировано из [20]). Прочно связанный урацилат затем поворачивается вокруг оси, расположенной перпендикулярно кольцу, и формируется новая C–C связь с аспаратом как уходящей группой. Последующее депротонирование C⁵ и протонирование N¹ приводит к образованию ψ.

В) TGT реакция протекает через нуклеофильную атаку каталитического аспартилкарбоксилата на C¹¹ атом рибозы с образованием ковалентного промежуточного продукта TGT–РНК. После замены гуанина на модифицированное основание, нуклеофильная атака основания N⁹ на гликозидный углеродный атом приводит к образованию модифицированного продукта.

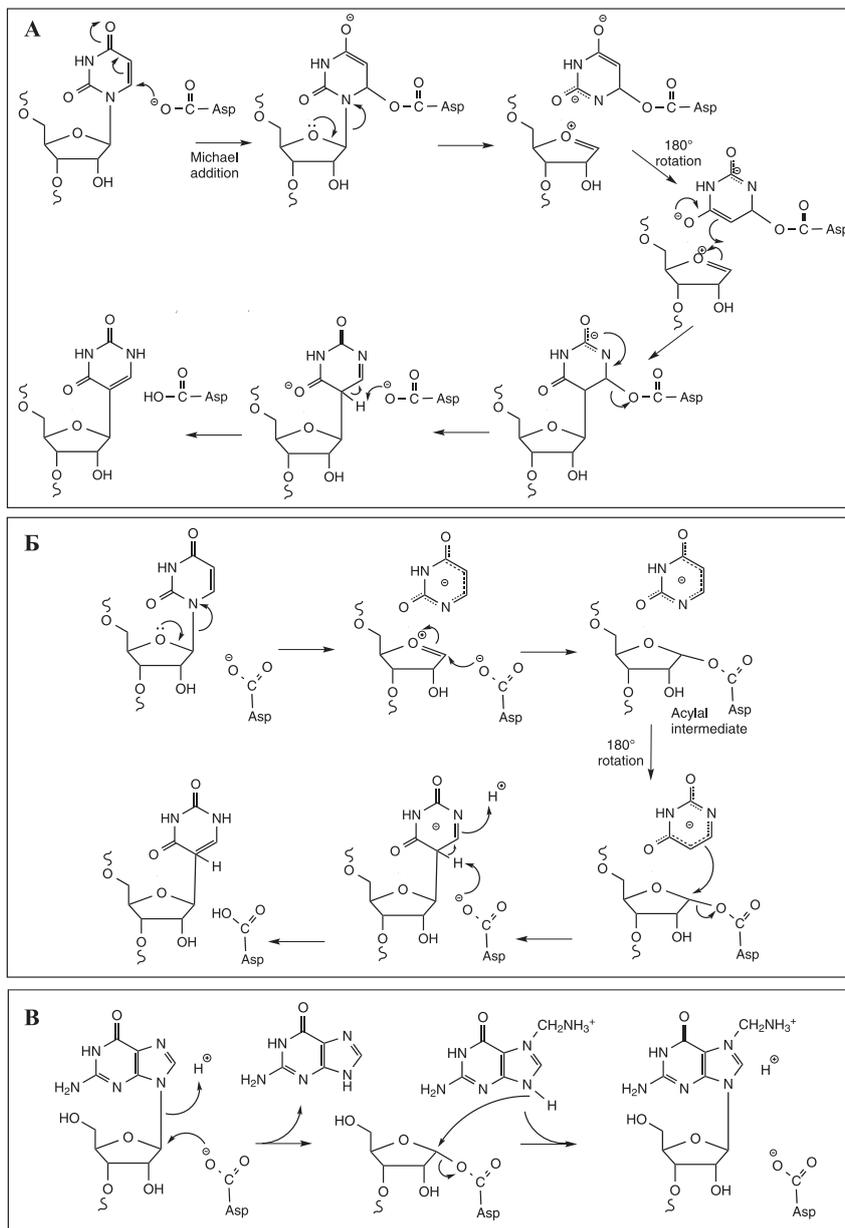


Рис. 6. Подпись к рис. дана на стр. 50

рибозы, высвобождение аниона урацила и образование ацильного интермедиата (рис. 6, б). В обоих случаях образование псевдоуридина требует конечной стадии депротонирования атома С⁵ и протонирования по N¹. Необходимо отметить, что существует также третий альтернативный механизм, подразумевающий формирование промежуточного продукта, гликала, по крайней мере, при реакции фермента TguV с 5-фторуридином [59].

При превращении остатка уридина во псевдоуридин, конечный продукт реакции является термодинамически более устойчивым, чем уридин. Таким образом, при протекании этой реакции не должно быть потребления энергии. Однако активация связи С–N и ее последующее расщепление требует энергии, которая возникает в результате изменения конформации белка во время катализа (или на пред-каталитической стадии). Первая стадия изомеризации U в ψ может напоминать расщепление С–N гликозидной связи ДНК-гликозилазами во время начальных стадий репарации ДНК или в реакции обмена основаниями, катализируемой TGT (тРНК-гуанин-трансгликозилазами, см. ниже). Детальные исследования кинетических параметров конверсии U в ψ были выполнены на различных РНК-ψ-синтазах. Однако нельзя исключить того, что точный механизм может отличаться у разных классов ферментов, и поэтому данные, полученные на одном ферменте, не могут легко экстраполироваться на другой. Более того, было сделано предположение о том, что остаток Asp играет важную роль в кислотно-основном катализе, имеющем место при депротонировании С⁵, в то время как, до сих пор нет данных о специфическом кислотном протонировании N¹. Необходимы дополнительные работы в этом направлении [60, 61].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ тРНК-ГУАНИНТРАНСГЛИКОЗИЛАЗ

тРНК-гуанин-трансгликозилазы (TGT) катализируют реакцию обмена основаниями, в которой происходит расщепление гуанозин-N-гликозидной связи, протекающей по механизму двойного замещения. Реакция, катализируемая TGT, начинается с нуклеофильной атаки С^{1'}-атома рибозы карбоксильной группой Asp, что приводит к образованию ковалентного промежуточного продукта TGT–РНК. После замены гуанина на модифицированное основание, происходит нуклеофильная атака N⁹ атомом азотистого основания углеродного атома гликозида, приводящая к образованию модифицированного продукта (рис. 6, в) [24, 62]. Подобный TGT-опосредованный механизм требует протонирования замещаемого гуанина и депротонирование

приходящего гетероциклического основания. По-видимому, эта роль выполняется вторым остатком Asp, осуществляющим обмен протона с молекулой воды как сопряженной кислотно-основной парой [25]. Более того, недавно полученные данные по кинетике этого превращения свидетельствуют об участии 2'-ОН группы в стабилизации отрицательного заряда на нуклеофильном аспартате, возрастающего по мере разрыва гликозидной связи во время распада ковалентного комплекса [63].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ S⁴U-ТИОЛАЗЫ ThiI

ThiI катализирует перенос атома серы от донора в положение 4 в урдине через образование промежуточного продукта – персульфида (рис. 7) [29]. В большинстве бактерий, в качестве донора выступает персульфидная форма цистеин дисульфуразы IscS (40). IscS представляет собой пиридоксаль-5'-фосфат-зависимую цистеин-дисульфуразу, которая образует персульфидную группу на остатке цистеина в активном центре фермента за счет расходования свободного цистеина. Концевой атом серы затем переносится в ThiI, где он связывается с необходимым для катализа остатком Cys [30]. В метаногенных археях, IscS не является незаменимым ферментом для синтеза тиюридина и было показано, что S²⁻ является физиологически подходящим донором серы [64]. Для протекания процесса также необходимо присутствие активированного уридина, который также образуется с помощью ThiI за счет расходования АТФ [65]. В завершающей части реакции происходит перенос атома серы от промежуточного персульфидного продукта, образуемого с помощью ThiI, на активированный остаток уридина, что приводит к образованию тиюридина и дисульфидной связи на ThiI. Восстановление дисульфидной связи регенерирует ThiI для последующего цикла катализа [30].

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование реакций модификации РНК представляют собой сложную и важную область и касается огромного числа ферментов, химии и механизмов ферментативного катализа. Вместе с тем, детальное описание механизмов этих реакций представляет собой очень сложную задачу, несмотря на впечатляющее развитие методов мутагенеза, химических и структурных подходов. Более того, за некоторым исключением, характеристика кинетических параметров, включая идентификацию скорость-лимитирующей стадии, остается незавер-

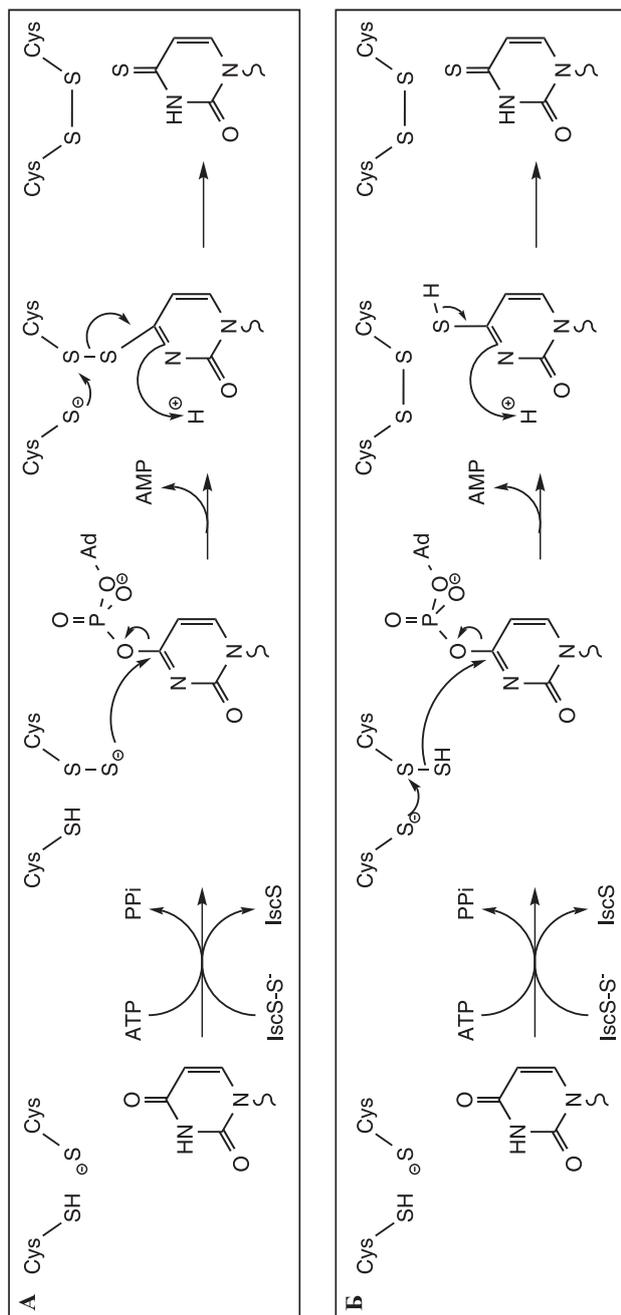


Рис. 7. Предполагаемый механизм образования тиоуридина, катализируемого ThI1 (адаптировано из [30]).

ThI1 катализирует перенос терминального атома серы от перисульфидной формы IscS (IscS-S-) на каталитически важный остаток Cys с образованием перисульфидного промежуточного продукта ThI1. ThI1 обладает АТФ-ной активностью при аденилировании уридина. Предложены два механизма для последней части реакции: А) терминальный атом серы из перисульфидного промежуточного продукта прямо атакует С' атом активированного уридина, или В) ThI1 генерирует сульфид водорода через образование внутрисульфидной связи, которая потом служит в качестве нуклеофила для замещения активированного кислорода в уридине.

шенной и это может служить препятствием для понимания механизмов ферментативного катализа. Например, анализ скорость-лимитирующих стадий превращения U в ψ проводился на множестве ферментов из бактерий и архей в экспериментах со стационарной и предстационарной кинетикой, и во всех случаях было показано, что собственно катализ и является скорость-лимитирующей стадией [24]. Но это не всегда так. Действительно, предстационарный анализ N-метиляции, катализируемого двумя аналогичными ферментами, Trm5 и TrmD, показал, что для них характерны разные скорость-лимитирующие стадии, что может быть связано с различиями в их структуре [66]. По крайней мере, просто образование промежуточного ковалентного комплекса не является достаточным для доказательства образования продукта. Чтобы быть истинным промежуточным соединением, комплекс должен быть химически и кинетически компетентным, что было продемонстрировано на примере TGT [63]. Другой аспект, которому не было уделено достаточного внимания, касается эффективности различных ферментов *in vitro* и *in vivo*. Несмотря на тот факт, что фермент способен катализировать специфическую реакцию *in vitro*, его роль в модификации РНК *in vivo* может зависеть от его реальной каталитической активности и эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hocine, S., Singer, R.H., and Grünwald, D. (2010) Cold Spring Harb. Perspect. Biol., **2**, a000752.
2. Lamond, A.I. (1991) Curr. Opin. Cell Biol., **3**, 493–501.
3. Machnicka, M.A., Milanowska, K., Osman Oglou, O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., Januszewski, W., Kalinowski, S., Dunin-Horkawicz, S., Rother, K.M., et al. (2013) Nucleic Acids Res., **41**, D262–267.
4. Helm, M. (2006) Nucleic Acids Res., **34**, 721–733.
5. Motorin, Y., and Helm, M. (2011) Wiley Interdiscip. Rev. RNA, **2**, 611–631.
6. Motorin, Y., and Helm, M. (2010) Biochemistry, **49**, 4934–4944.
7. Ansmant, I., and Motorin, I. (2001) Mol. Biol., **35**, 248–267.
8. Schubert, H.L., Blumenthal, R.M., and Cheng, X. (2003) Trends Biochem. Sci., **28**, 329–335.
9. Kozbial, P.Z., and Mushegian, A.R. (2005) BMC Struct. Biol., **5**, 19.
10. Watanabe, K. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 10368–10377.
11. Watanabe, K., Nureki, O., Fukai, S., Endo, Y., and Hori, H. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 34630–34639.
12. Cheng, X., and Roberts, R.J. (2001) Nucleic Acids Res., **29**, 3784–3795.
13. Hamdane, D., Argentini, M., Cornu, D., Myllykallio, H., Skouloubris, S.,

- Hui-Bon-Hoa, G., and Golinelli-Pimpaneau, B.* (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 36268–36280.
14. *Hutcheson, R.U., and Broderick, J.B.* (2012) *Metallomics*, **4**, 1149–1154.
15. *Vey, J.L., and Drennan, C.L.* (2011) *Chem. Rev.*, **111**, 2487–2506.
16. *Grove, T.L., Benner, J.S., Radle, M.I., Ahlum, J.H., Landgraf, B.J., Krebs, C., and Booker, S.J.* (2011) *Science*, **332**, 604–607.
17. *Noma, A., Kirino, Y., Ikeuchi, Y., and Suzuki, T.* (2006) *EMBO J.*, **25**, 2142–2154.
18. *Hamma, T., and Ferré-D'Amaré, A.R.* (2006) *Chem. Biol.*, **13**, 1125–1135.
19. *Charette, M., and Gray, M.W.* (2000) *IUBMB Life*, **49**, 341–351.
20. *Mueller, E.G., and Ferré-D'Amaré, A.R.* (2009) In: *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*. Landes Biosciences, Austin, USA epp. 363–376.
21. *Ramamurthy, V., Swann, S.L., Paulson, J.L., Spedalieri, C.J., and Mueller, E.G.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 22225–22230.
22. *Motorin, Y., Keith, G., Simon, C., Foiret, D., Simos, G., Hurt, E., and Grosjean, H.* (1998) *RNA*, **4**, 856–869.
23. *Behm-Ansmant, I., Urban, A., Ma, X., Yu, Y.-T., Motorin, Y., and Branlant, C.* (2003) *RNA*, **9**, 1371–1382.
24. *Kittendorf, J.D.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 42369–42376.
25. *Kittendorf, J.D., Barcomb, L.M., Nonekowsky, S.T., and Garcia, G.A.* (2001) *Biochemistry*, **40**, 14123–14133.
26. *Chervin, S.M., Kittendorf, J.D., and Garcia, G.A.* (2007) *Methods Enzymol.*, **425**, 121–137.
27. *Stengl, B., Reuter, K., and Klebe, G.* (2005) *Chembiochem*, **6**, 1926–1939.
28. *Rajakovich, L.J., Tomlinson, J., and Dos Santos, P.C.* (2012) *J. Bacteriol.*, **194**, 4933–4940.
29. *Palenchar, P.M., Buck, C.J., Cheng, H., Larson, T.J., and Mueller, E.G.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8283–8286.
30. *Mueller, E.G., Palenchar, P.M., and Buck, C.J.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 33588–33595.
31. *Arragain, S., Handelman, S.K., Forouhar, F., Wei, F.-Y., Tomizawa, K., Hunt, J.F., Douki, T., Fontecave, M., Mulliez, E., and Atta, M.* (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 28425–28433.
32. *Meyer, S., Scrima, A., Versées, W., and Wittinghofer, A.* (2008) *J. Mol. Biol.*, **380**, 532–547.
33. *Armengod, M.-E., Moukadiri, I., Prado, S., Ruiz-Partida, R., Benitez-Páez, A., Villarroja, M., Lomas, R., Garzón, M.J., Martínez-Zamora, A., Meseguer, S., et al.* (2012) *Biochimie*, **94**, 1510–1520.
34. *Osawa, T., Ito, K., Inanaga, H., Nureki, O., Tomita, K., and Numata, T.* (2009) *Structure*, **17**, 713–724.
35. *Zhou, C., and Huang, R.H.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 16142–16147.
36. *Hou, Y.-M., and Perona, J.J.* (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 278–286.
37. *Guelorget, A., and Golinelli-Pimpaneau, B.* (2011) *Structure*, **19**, 282–291.
38. *Iwata-Reuyl, D.* (2003) *Bioorganic Chem.*, **31**, 24–43.
39. *Spedalieri, C.J., Ginter, J.M., Johnston, M.V., and Mueller, E.G.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12758–12759.

40. Mueller, E.G. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 185–194.
41. Motorin, Y., Lyko, F., and Helm, M. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1415–1430.
42. Behm-Ansmant, I., Helm, M., and Motorin, Y. (2011) *J. Nucleic Acids*, **2011**, 408053.
43. Christian, T., Lahoud, G., Liu, C., Hoffmann, K., Perona, J.J., and Hou, Y.-M. (2010) *RNA*, **16**, 2484–2492.
44. Zheng, S., and Shuman, S. (2008) *RNA*, **14**, 2297–2304.
45. De la Peña, M., Kyrieleis, O.J.P., and Cusack, S. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4913–4925.
46. Maravić, G., Feder, M., Pongor, S., Flögel, M., and Bujnicki, J.M. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**, 99–109.
47. Decroly, E., Debarnot, C., Ferron, F., Bouvet, M., Coutard, B., Imbert, I., Gluais, L., Papageorgiou, N., Sharff, A., Bricogne, G., et al. (2011) *PLoS Pathog.*, **7**, e1002059.
48. Hodel, A.E., Gershon, P.D., and Quioco, F.A. (1998) *Mol. Cell*, **1**, 443–447.
49. Chan, C.M., Zhou, C., Brunzelle, J.S., and Huang, R.H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17699–17704.
50. Tkaczuk, K.L., Obarska, A., and Bujnicki, J.M. (2006) *BMC Evol. Biol.*, **6**, 6.
51. Huang, R.H. (2012) *Biochemistry*, **51**, 4087–4095.
52. Foster, P.G., Nunes, C.R., Greene, P., Moustakas, D., and Stroud, R.M. (2003) *Structure*, **11**, 1609–1620.
53. Lee, T.T., Agarwalla, S., and Stroud, R.M. (2005) *Cell*, **120**, 599–611.
54. Lee, T.T., Agarwalla, S., and Stroud, R.M. (2004) *Structure*, **12**, 397–407.
55. Nishimasu, H., Ishitani, R., Yamashita, K., Iwashita, C., Hirata, A., Hori, H., and Nureki, O. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8180–8185.
56. Challand, M.R., Salvadori, E., Driessener, R.C., Kay, C.W.M., Roach, P.L., and Spencer, J. (2013) *PloS One*, **8**, e67979.
57. Huang, L., Pookanjanatavip, M., Gu, X., and Santi, D.V. (1998) *Biochemistry*, **37**, 344–351.
58. Gu, X., Liu, Y., and Santi, D.V. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14270–14275.
59. Miracco, E.J., and Mueller, E.G. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11826–11829.
60. Hamilton, C.S., Spedaliere, C.J., Ginter, J.M., Johnston, M.V., and Mueller, E.G. (2005) *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 322–334.
61. Phannachet, K., Elias, Y., and Huang, R.H. (2005) *Biochemistry*, **44**, 15488–15494.
62. Romier, C., Reuter, K., Suck, D., and Ficner, R. (1996) *Biochemistry*, **35**, 15734–15739.
63. Garcia, G.A., Chervin, S.M., and Kittendorf, J.D. (2009) *Biochemistry*, **48**, 11243–11251.
64. Liu, Y., Zhu, X., Nakamura, A., Orlando, R., Söll, D., and Whitman, W.B. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 36683–36692.
65. You, D., Xu, T., Yao, F., Zhou, X., and Deng, Z. (2008) *Chembiochem.*, **9**, 1879–1882.

66. Zhou, J., Lv, C., Liang, B., Chen, M., Yang, W., and Li, H. (2010) *J. Mol. Biol.*, **401**, 690–695.
67. Wright, J.R., Keffer-Wilkes, L.C., Dobing, S.R., and Kothe, U. (2011) *RNA*, **17**, 2074–2084.