

# БАКТЕРИАЛЬНЫЕ 5S рРНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА СТС

©2008 г. Г. М. ГОНГАДЗЕ, А. П. КОРЕПАНОВ,  
А. В. КОРОБЕЙНИКОВА, М. Б. ГАРБЕР  
*Институт белка РАН, Пущино, Московская область*

I. Введение. II. Семейство СТС и его представители. III. 5S рРНК-связывающие свойства белков СТС. IV. Белок СТС в рибосоме. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Рибосома осуществляет синтез белков в любой клетке. Консервативность элементов структуры рибосомы определяет универсальность ключевых этапов биосинтеза белка. Однако окружающая среда и эволюционный путь, пройденный организмом, накладывают свой отпечаток на структуру и функционирование его компонентов. Рибосома как любой клеточный компонент несет в себе эволюционные особенности конкретного организма, группы родственных организмов или биологического царства, в целом. Современные рибосомы содержат 6–8 десятков разных рибосомных белков, и только тридцать четыре из них консервативны во всех доменах жизни [1]. Другая часть рибосомных белков является эволюционным приобретением Архей, Бактерий или Эукариот. Роль этих белков в функционировании аппарата трансляции пока мало изучена. Изучение свойств белков этой группы является важной и перспективной задачей не только в фундаментальном, но и в прикладном аспекте.

---

*Принятые сокращения:* СТС – catabolite controlled, белок, ген которого (cts) находится под контролем продуктов катаболизма. Сокращенные названия индивидуальных рибосомных белков приводятся в соответствии с их принадлежностью рибосомной субчастице («L», Large) и порядковому номеру на двумерной электрофореграмме (например, L25). В сокращенное название рибосомного белка TL5 добавлена первая буква из названия организма («T», *Thermus*).

Адрес для корреспонденции: [gongadze@vega.protres.ru](mailto:gongadze@vega.protres.ru)

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ № 08-04-00459 и Программы Президента РФ по поддержке Ведущих научных школ (НШ-751.2008.4).

Одним из примеров такой эволюционной особенности аппарата трансляции бактерий является белок семейства СТС. Этот белок встречается в большинстве таксонов Бактерий и не обнаружен в Археях и Эукариотах. Среди известных представителей семейства СТС есть рибосомные и стрессовые белки. Рибосомная 5S рНК является единственной известной мишенью для белка СТС. Несмотря на почти сорокалетнюю историю изучения некоторых белков этого семейства, вопросы об их функции в клетке и о конкретной роли в работе аппарата трансляции остаются до сих пор открытыми.

Данный обзор является первым, в котором собрана и систематизирована накопленная информация о белках семейства СТС. В обзоре дана краткая историческая справка об известных белках данного семейства, обсуждаются вопросы их структурной организации и распространенности у представителей известных таксономических групп бактерий. Описываются структурные особенности бактериальной 5S рНК и белка СТС, определяющие их специфическое взаимодействие. Учитывая положение белка СТС в рибосоме и его межмолекулярные контакты, обсуждается возможная роль его комплекса с 5S рНК в функционировании бактериальной рибосомы.

## II. СЕМЕЙСТВО СТС И ЕГО ПРЕДСТАВИТЕЛИ

В 1996 г. нами было показано, что рибосомный 5S рНК-связывающий белок TL5 *Thermus thermophilus* и основной стрессовый белок СТС *Bacillus subtilis* гомологичны по всей длине полипептидной цепи [2]. Кроме того, оказалось, что N-концевая часть указанных белков гомологична рибосомному белку L25 *Escherichia coli*. Эта работа явилась ключевой в объединении данных белков и их гомологов в семейство СТС. В дальнейшем было установлено, что геном большинства известных бактерий содержит один ген, кодирующий белок данного семейства [3, 4]. Более того, оказалось, что белки семейства СТС являются прерогативой бактерий, поскольку ген *ctc* не обнаружен в геномах известных Архей и Эукариот [5]. Хотя на сегодняшний день семейство СТС насчитывает более 300 представителей, для большинства из них известна только открытая рамка считывания в геноме. Свойства только нескольких белков семейства можно считать исследованными. Одним из первых обнаруженных и изученных представителей данного семейства, который и дал имя семейству, является основной стрессовый белок СТС *B. subtilis*. В 1979 г. Хелденвонгом и Лосиком была обнаружена минорная  $\sigma$ -субъединица ( $\sigma$  37) РНК-полимеразы *B. subtilis*, которая активировалась в стрессовых условиях

и на первых этапах спорообразования [6, 7]. Был идентифицирован специфический промотор, узнаваемый данной  $\sigma$ -субъединицей РНК-полимеразы [8, 9]. Этот промотор, как и ген, находящийся под его контролем, были названы *ctc* (catabolite controlled) (см. обзор [10]). Впоследствии Волькером с соавторами было установлено, что один из основных стрессовых белков *B. subtilis*, GSP10, является продуктом гена *ctc* [11]. Белок СТС является одним из белков, которые вырабатываются клетками *B. subtilis* в ответ на различные формы стресса [12]. Недавно было показано, что данный белок специфически связывается с 5S рРНК [13], а при стрессе обнаруживается в рибосомной фракции [14]. Таким образом, белок СТС *B. subtilis* можно считать временно ассоциирующим с рибосомой. Недавно, белок СТС, вырабатываемый клеткой в ответ на разные формы стресса, был обнаружен еще у одного представителя класса Bacilli, *Listeria monocytogenis* [15, 16]. Вероятно, белок СТС этого организма тоже может ассоциировать с рибосомой при стрессе. Кроме того, показано, что нокаут гена *ctc* в клетках *B. subtilis* приводит к угнетению их роста при стрессе и нарушению процесса спорообразования [17]. Таким образом, можно предположить, что одной из функций белков семейства СТС является поддержание рибосом в рабочем состоянии при стрессе или спорообразовании некоторых бактерий. В то же время некоторые белки семейства обнаружены в рибосомах экспоненциально растущих клеток, то есть являются истинными рибосомными белками. Первым из обнаруженных представителей семейства СТС является рибосомный белок L25 *E. coli*. В 1972 г. в работе Хорна и Эрдманна было показано, что одним из рибосомных белков *E. coli*, специфически связывающихся с 5S рРНК, является белок L25 [18]. Другой белок семейства СТС, рибосомный 5S рРНК-связывающий белок TL5 *T. thermophilus*, был обнаружен нами в 1993 г. [19]. Этот многодоменный белок (206 остатков) в два раза больше рибосомного белка L25 (94 остатка) и соразмерен основному стрессовому белку СТС (204 остатка) *B. subtilis* [2, 20, 21]. Оказалось, что именно N-концевой участок белка TL5, гомологичный белку L25, ответствен за связывание 5S рРНК [22]. Кроме того, в рибосоме *Deinococcus radiodurans* обнаружен многодоменный белок СТС (238 остатков), сравнимый по размеру с белками TL5 *T. thermophilus* и СТС *B. subtilis* [23]. Этот белок тоже взаимодействует с 5S рРНК своим N-концевым доменом. Наконец, совсем недавно было продемонстрировано, что белки СТС *Enterococcus faecalis* и *Nostoc* sp. способны специфически связываться с 5S рРНК [24].

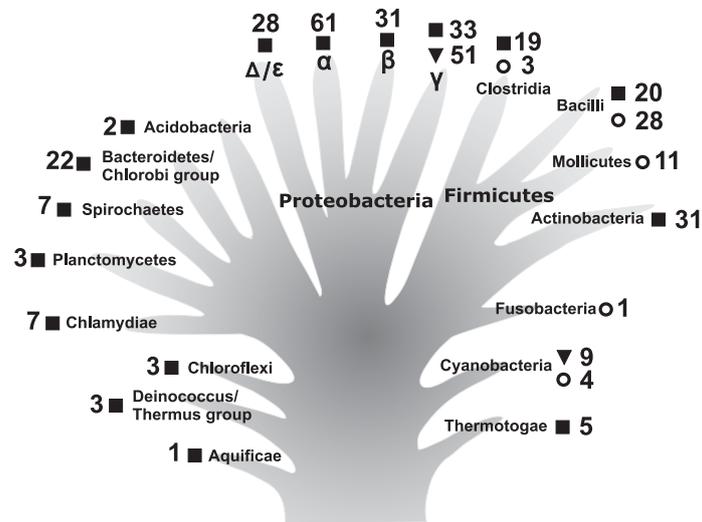


Рис. 1. Встречаемость белков семейства СТС в представителях ряда бактериальных таксонов.

Информация для анализа взята из GenBank NCBI [3] только для полностью расшифрованных геномов. Полученные данные для большей наглядности представлены на фоне гипотетического эволюционного древа. Символы указывают наличие генов, кодирующих многодоменные (■) и однодоменные (▼) белки, а также отсутствие таких генов в геноме (○). Численные значения рядом с символом указывают количество расшифрованных геномов. В большинстве случаев представленные таксономические группы ограничены уровнем надтипов или типов (исключениями являются типы Proteobacteria и Firmicutes, которые представлены классами). Символами α, β, γ и Δ/ε обозначены субдивизионы (классы) типа Proteobacteria.

Таким образом, одно общее свойство всех перечисленных выше белков семейства СТС очевидно – они способны образовывать специфический комплекс с рибосомной 5S РНК.

За последние десять лет стремительно выросло число расшифрованных бактериальных геномов [3, 4]. На сегодняшний день накоплена информация о геномах нескольких сотен представителей различных бактериальных таксонов. Это позволило нам провести сравнительный анализ основных характеристик белков семейства СТС и получить информацию об их распространенности в разных филогенетических группах. Как видно на рис. 1, многодоменные белки СТС встречаются у представителей большинства указанных бактериальных таксонов, включая самые древние (Aquificae, Thermotogae и Deinococcus-Thermus group). По-видимому, первые белки семейства СТС, когда они

появились в бактериях, были многодоменными. Все известные на сегодняшний день белки СТС содержат так называемый «5S рРНК-связывающий домен» [25]. Единственным исключением можно было бы считать *Aquifex aeolicus*, у которого, как представлено в GenBank NCBI [3, 26], ген *ctc* кодирует белок, лишенный первых 50 аминокислотных остатков 5S рРНК-связывающего домена. Такой белок был получен, и оказалось, что он не связывается с 5S рРНК [13]. Однако при внимательном анализе соответствующего участка генома данного организма, мы обнаружили ошибку (пропущенный нуклеотид). В результате этой ошибки было неверно определено положение старт кодона. В действительности данный ген кодирует белок с полноразмерным 5S рРНК-связывающим доменом. Кроме того, ранее было показано, что белок L25, лишенный первых 20 аминокислотных остатков, и N-концевой фрагмент белка TL5 (91 аминокислотный остаток), лишенный 10 C-концевых остатков, утрачивают свои 5S рРНК-связывающие свойства [22, 27]. Из всего сказанного следует, что только белок СТС, имеющий домен, соразмерный белку L25 (5S рРНК-связывающий домен), способен специфически взаимодействовать с рибосомной 5S РНК. Поэтому, считая, что 5S рРНК является главной мишенью для белков СТС, вполне логично предположить, что функционирование первых белков СТС уже было связано с работой аппарата трансляции.

Стоит обратить внимание еще на одну интересную особенность белков семейства СТС, которая отражена на рис. 1. Только представители типа Cyanobacteria и  $\gamma$ -субдивизиона Proteobacteria имеют однодоменный белок СТС (например, *Nostoc* sp. и *E. coli*). При этом среди известных представителей указанных таксономических групп эта форма белка преобладает. По всей видимости, сохранение у данных бактерий только так называемого «5S рРНК-связывающего домена» оказалось достаточным для выполнения белком СТС его функций. Кроме того, в геномах многих представителей типа Firmicutes ген, кодирующий белок СТС, вообще не обнаружен (см. рис. 1). В начале обзора нами уже было отмечено, что у таких представителей класса Bacilli, как *B. subtilis* и *L. monocytogenis*, белок СТС вырабатывается клеткой только в ответ на разные формы стресса. При этом нокаут гена *ctc* в клетках *B. subtilis* не влияет на их ростовые характеристики при нормальных условиях роста [17]. Все эти наблюдения наводят на мысль о возможности так называемой «регрессивной эволюции» белков СТС у представителей отдельных таксонов бактерий. По всей вероятности, изменившиеся условия жизни позволили некоторым бактериям либо полностью, либо частично обходиться без белка СТС.

Уже в первых работах [28, 29], в которых был проведен сравнительный анализ первичных структур нескольких известных белков семейства СТС, были установлены их главные особенности. Несмотря на отсутствие выраженной гомологии между белками этого семейства, несколько аминокислотных остатков в них идентичны. При этом большая часть из них сосредоточена в N-концевом (так называемом «5S рРНК-связывающем») домене белка (R10, R19, P25, Y29, G30, H85 и D87 по нумерации белка TL5). Для более объективной оценки степени консервативности отдельных остатков в белках СТС, используя программу ClustalW [30, 31], мы сравнили первичные структуры 300 белков семейства из всех изученных таксонов. При этом картина строго консервативных аминокислотных остатков практически не изменилась. На рис. 2 приводится сравнение первичных структур белков СТС типичных представителей крупных таксономических групп бактерий, в которых эти белки обнаружены. Данный рисунок полностью отражает картину, полученную для трех сотен белков.

Рис. 2. Сравнение первичных структур типичных представителей семейства СТС из ряда таксономических групп бактерий, в которых они обнаружены на сегодняшний день. →

Для сравнения структур была использована программа ClustalW [30, 31]. Первичные структуры: **Mycob. tub.** – *Mycobacterium tuberculosis*, Actinobacteria, (UniProtKB/Swiss-Prot, P66121); **Rhod. balt.** – *Rhodopirellula baltica*, Planctomycetes, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q7UKU9); **Therm. mar.** – *Thermotoga maritima*, Thermotogae, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q9X1W2); **Ther. ther.** – *Thermus thermophilus*, Deinococcus/Thermus group, (UniProtKB/Swiss-Prot, P56930); **Ros. sp. RS1** – *Roseiflexus* sp. *RS-1*, Chloroflexi, (UniProtKB/TrEMBL, A5UQF4); **Chlor. tep.** – *Chlorobium tepidum*, Bacteroidetes/Chlorobi group, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q8KCQ1); **Neiss. men.** – *Neisseria meningitidis*,  $\beta$ -subd. Proteobacteria, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q9JUX7); **Esche. coli** – *Escherichia coli*,  $\gamma$ -subd. Proteobacteria, (UniProtKB/Swiss-Prot, P68919); **Ricket. pr.** – *Rickettsia prowazekii*,  $\alpha$ -subd. Proteobacteria, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q9ZCV3); **Solib. usi.** – *Solibacter usitatus*, Acidobacteria, (UniProtKB/TrEMBL, Q01QR2); **Parach. sp.** – *Parachlamydia* sp. *UWE25*, Chlamydiae, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q6MAT1); **Aquif. aeo.** – *Aquifex aeolicus*, Aquificae, (UniProtKB/Swiss-Prot, O66678); **Desul. psy.** – *Desulfotalea psychrophila*,  $\Delta/\epsilon$ -subd. Proteobacteria, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q6AJL8); **Flav. psyc.** – *Flavobacterium psychrophilum*, Bacteroidetes/Chlorobi group, (UniProtKB/Swiss-Prot, A6GVZ1); **Bacil. sub.** – *Bacillus subtilis*, Bacilli, (UniProtKB/Swiss-Prot, P14194); **Clost. per.** – *Clostridium perfringens*, Clostridia, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q8XJ87); **Helic. hep.** – *Helicobacter hepaticus*,  $\Delta/\epsilon$ -subd. Proteobacteria, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q7VG30); **Trep. pall.** – *Treponema pallidum*, Spirochaetes, (UniProtKB/Swiss-Prot, O83387); **Thermo. el.** – *Thermosynechococcus elongates*, Cyanobacteria, (UniProtKB/Swiss-Prot, Q8DLG3).

Идентичные или строго консервативные (>90%) аминокислотные остатки (\*) и консервативные (<90%) остатки (:) указаны на нижней строке. Консервативные остатки, взаимодействующие с 5S рРНК, отмечены белыми символами.

```

1          10          20          30          40          50          60
|Mycob. tub. | --MAKASASNLQRLVTVTETGKGGASRRARAGKI PAVLYCHGAEF-QHLELPGHDYAAVLRHSGTNAVLTLD
|Rhod. balt. | MPRSVFVMTDDVIQVTKRSTGTAATRRLRDGHVPAVLYCHGEAN-EHLAVPSAQVKGLLRHSHKTVQLSGD
|Therm. mar. | -----MVSLEARVREVKGKREARRLRGGEVPAVVYGPATEP-IPVYIKRVSLEKIFFTISEATPTQLI
|Ther. ther. | -----MEYRLKAYYRE--GE-KPSALRAGKLPQVMYNRHLN--RKVYVDLVEFDKVFQASIHVVIVLE
|Ros. sp. RS1 | -----MSKFTLSLEPESV-LGKVKRLRSGTLPATVYKGIETP-IAVQIDARSFOAIYRQAGRTSLIEHL
|Chlor. tep. | -----METRALSVNLRSV-KKNGAAKLRGCOVPAVVYHKGEAT-VAISVEEISLNKLVHSS--ESHMIDLQ
|Neiss. men. | -----MTYEIQASVREAOCTGASRRLRGEOIPGIIYGEQQEP-VAIVDHTKTVYALEKESFHTALIKL
|Esche. coli | -----MFTINAEVREKQCKGASRRLRANKFPAILYGGKEAP-LAIELDHDKVMNQAKAEFYSEVLT I
|Ricket. pr. | -----MSGILLELEAKSREFTGTAARALRREGRPAIIYGAGKTP-ISISLKEKEITKYYRKPAPFSQLINL
|Solib. usi. | -----MIKDITVPAELNRSRKNEARRTMAGNI PAVVY GAYQEP-VSVAVSRDVIKIRSNCTGLNTFTL
|Parach. sp. | -----MKAILRNGKSKSEINRLRRCMI PAVVYVRGKEG-ETLAINSAEFNSYLHRHVKSHLPTT I
|Aquil. aeo. | -----MRVVKVLLRKPGRKSDLKRRECNL PVEIYKGVEN-KHAWINVKDFA SLPHEAFLEAELD
|Desul. psy. | -----MFQVEMTASVREAFGKGPMPRRRQQGIT PAVVY GAGKAA-LPLQMDAKILMTQVLEPSRVNTVSL
|Flav. psyc. | -----MKSITIKGSERESYKVAATKALNAGAVPCVLYG-GDQP-VHFSADERAFKSLVVT PNAHTVIVY
|Bacil. sub. | -----MATLTAKE RDTFRSSLRNIRPSGHVPGIYKQDGN-KPVSLSDELITLDRDGEKNAVITL
|Clost. per. | -----MMENLQVNRDKKTRHSSRQCRKGLVPGVIYKGIKNN-PLFEIGELELHALSVTGEHGLSIN
|Helic. hep. | -----MLEGQIRRSISKSQAALRNDGL IANVYKGGQQN-IHCAFKNDFIKAMQKTKTILFFPVQ
|Trep. pall. | -----MDERRLKGKRRVQLGKYAAVRGRKGRLPAMVYDHRGVS-VPLELAQQDFDLRFRALTRSTVLSLE
|Thermo. el. | -----MSRSLATEGQLR--PA DAKPNALRNGKI PAVLYGPTTESSISLVVDTRAEE LLVRDARPKQTEIQL
          :          *          *          *          *          *          :
          :          :          :          :          :          :          :
70          80          90          100          110          120          130
IAGKEQ-----LALTKALHIHPIRRITICRHDLLVVRREGKVVVEVSVVVEG---QAG---PDTLVTQETNSIEIEAEALSIPPEQL
VD---E-----TALVSDMQWDPGLGIEVLDLIRVNLKEKVELGVPI VLHG---EAVGVREGGMLENVHVEVIRCSAGSIPDNL
IKDDQGNVAEKTVFLKMQQRDKVSETVVVDIYFYE PTKGHRMRI NVPLKVVGK---PVGVE-KGGFLEVFHEEIPVE TDPDKVPEI
LPDGGP-----LPTLVQRVNLDKRRRRRPEPDDFFVLSD-EPVEMYVPLRFVGT---PAGVR-AGGVLEIHRDILVKVSPRNPPEFI
IAGHPP-----LAAFHALQRHPVTRDIIBDFRADVLRQEVAVPLHIEGK---SPLVESGEAVLNQVLS TIEIRALPTAIPAH I
YDPGKS-----VRSFTKDVQFDPVTRDVIHDFQLFSTDEVVEVEVPI HLEGE---CPGVKIGGGKIQ INVHTLP LKPKPEAMPPEHF
SLNGET-----KDIVIVRDFQMHPFRREVCHDFQA VKADQPVRI RVPLHIVNAENSQAVKLQGGGRVSLNLT TVEVVALPANIPAF L
VVDGKE-----IKVKAQDVRHYPKPKLQHDFF--VRA-----
TIDKKQ-----YKVLPAVELHPVTDIVRHDFVVFLEAKT-QKMEVPI VYEGKERALGVK-RGGYFN I IKRRVILLCDVNNIPRNV
ATIAGGET---T PVMIVDRQVDPIKSTLLHDFKRVVDLTKRIRVSVVPFTEGE---PAGVKVQGGLE IISRAIEIE CLPDDIPEKF
FTLVDEKG-SERRVLVKDIQYAITTYQVMBDFEELIDDHKINVKVPI ECTGT VDCGVK-LGGVLRQVIRHARIRCLPDMPSFF
GETR-----VCLLKDIQFGWLGNPNHIDLDYLSNVVEIEVEVPI EFGVT---PAGVE-AGGTFE PVMHTLTIKAPPAKIPKFI
SVDGQD-----AKNVVIAEQSDPVTDALVHDFDCE IDLDQAREFTVPVTFEFT---PKGVD-LGGRLESHLT SVILKAKPLDINEF
EGGKSY-----NAVMQDIQVHPVTDKIIHDFDYQLFEDKEVTMEVFPVRI IGT---SPGVLLGGVLR LNSRKLKVKALPANLDFL
VSGEKH-----SVMVTDLQTDPLKNEITHDFDQVNMSEIEVEVPI HLTG---EAI GVKNGVQLQPLYALT VKAKKPAIIPQI I
SQEGLN-----TLI KEVQRDPVTRRVIHDFLEKVEGNEEIE TAVPI NYVG---EEYINKLDAVLQKNLDSIKVKCSPSNI PKGV
GKKTLE-----VVI QEYQKDPVTNTLHDFDLLLLAQKG I LNKYKVPV IVKGN---AKGLKNKGVLP I STKRI SVKCAENL PNY
LDGGEVTF-----CVFVKDYQHNMVSDRVEHDFVFAVEESVPLRMIRLQLCGS---PEGVRYGARLEKGLSYIEVESLPRNLDRV
SIPDLPWQG---TVVLQEVQAHPAKDTLYHLSFL-AKAEN-----
          :          :          :          :          :          :          :
          :          :          :          :          :          :          :
140          150          160          170          180          190          200          210
TVSIEGAE-PGTQLTAGQIA--LPAGVSLISDPDL LVNVVKAP TAELEGEV--AGAEAEAEAAVE AGEAEAAAGESE-----
VLEVSLELGVGEHKTAGDLT--LPEGVELITDQDVVIAH IEAQ-RDEE IAEAG---DALAEPEVISKGSGEAE-----
EVDVSSLD-LGDVVIHARDLK--LPEGVKCLEEEEA VVS VLVKVAIEEATE--EEEEAAEPEVIKR-KEEEEE-----
EVDVSGLE-IGDSLHADS LK--LPPGVELAVSPEET IAAVVPPE DVE-KLAEE--AAAEVAEPEVIKKGKEEEEE-----
TVDISALDSFDKSIHARDLM--LPPGVTLVTPGEE LVVGLAHTRAAGEEEEE--AAETPAEPELVREERRESKEEEE-----
TIDVSALE-LGQTLHIRDLQA I AEPGVQILGDADT SVVSVVAPRKEAE TAAEG---ATAEA-----
DLDCAEVV-AGDILHLSDIK--LPEGVESVSLKRNEENLAVATVTKKR-----
-----
TIDVTNMP-IGTSLKSQVE--LPKGC SFI TKKEFVLAT IIGRRGVKTEIEGE--QEVAEAI Q-----
VNVSELM-IGQSKRGSDVA--LSGSMKLVSDPQTVIAH I VALRAEAAATPAE GAAA PAAAEPEVAKKGKKDEAPAAEEKGKK
ELDQVELG-LKQSKRLKDMN--IPETVRPL IDMNEVVAV IVKR-----
VVDVSGLG-LGEALHVRDIT--PPEGCMILDNPEETVAVVYEPPEEVI GEEETGAEETGETEATS-----
VINIADLA-IDEQLTVADVA--LAENVMVTPAARVMVAVLK-----
DADI SLE-MGNKIYV TALA-NEKYI LHPENTVVCQVR I SRAAMKAAQEA AKAAKAPAGKKK-----
EADISSLE-VNEVLT IADLP--AGGDYFNHESDE VVAS I LPPQQEAEAEVDEEESA DAQPEGENEQ-----
NLMVGRAK-PGDQFKIADVE--FGNEITVVDDLNS IVASVSYDQKI I TQEVVDQVEAENRAKES-----
EIDVSDL-DVGD SILLRDLR--QFDNVNVLNRPSAVVGVIKAK-----
VLDISGLG-AGDVRVRDVP--LPASVVVLSDPDAVIVALSSA SEAGSPAGARTG-----
          :          :          :          :          :          :          :
          :          :          :          :          :          :          :

```

Рис. 2. Подпись к рисунку дана на предыдущей странице.

Таблица.  
**Частота встречаемости аминокислотных остатков  
 5S рРНК-узнающего модуля в трехстах белках семейства СТС**

Аминокислотный остаток в белках TL5 (L25)	Количество наиболее часто встречающихся остатков	Количество других остатков
R10 (R9)	R – 291	Q – 3; K – 6
R19 (R21)	R – 295	K – 5
Y29 (Y31)	Y – 293	I – 1; F – 6*
H85 (H88)	H – 298	N – 1; S – 1
D87 (D90)	D – 286	E – 4**; S – 9***; A – 1***

Эти остатки присутствуют в белках СТС представителей: \* –  $\alpha$ -субдивизион Proteobacteria; \*\* – класс Bacilli; \*\*\* – тип Cyanobacteria.

Видно, что всего семь аминокислотных остатков N-концевого домена строго консервативны в белках СТС подавляющего большинства таксонов. Пять из них являются остатками, которые участвуют во взаимодействии белков L25 и TL5 с 5S рРНК [25] (более подробно об этом см. в главе III). Все это может свидетельствовать о выраженной консервативности во взаимодействии между белками семейства СТС и 5S рРНК у большинства бактериальных организмов. Полная картина частоты встречаемости указанных пяти остатков в известных белках семейства представлена в таблице. Аналогичный результат, только для 150 белков семейства СТС, был описан нами ранее [25]. Встречаемость данных остатков в белках семейства составляет 95–99%. Как видно, немногочисленные исключения не распределены случайным образом среди разных бактерий. Большинство из них встречается в белках организмов, принадлежащих вполне конкретным таксономическим группам. Такие исключения оказались характерны для всех известных белков СТС типа Cyanobacteria, отдельных представителей класса Bacilli и  $\alpha$ -субдивизиона Proteobacteria (см. подробнее в главе III). Указанные исключения подтверждают ранее высказанную мысль об эволюционной обособленности некоторых групп бактериальных организмов.

В заключение этого раздела хотелось бы сказать несколько слов о С-концевой части (дополнительных доменах) многодоменных белков семейства СТС. Таких белков большинство в семействе. Сравнение первичных структур данных белков (см. рис. 2) показывает, что в отличие от «5S рРНК-связывающего домена» белка СТС, его дополнительные домены обладают большей вариабельностью и

практически не имеют законсервированных эволюцией отдельных аминокислотных остатков или их групп. Однако было установлено, что остатки, формирующие гидрофобное ядро второго домена белка TL5, сохранились в других белках семейства [29]. Это указывает на то, что уникальная пространственная структура второго домена белка СТС может сохраняться и в других представителях семейства.

### III. 5S рРНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ СТС

5S рРНК является неотъемлемым компонентом рибосом всех изученных организмов. Несколько рибосомных белков образуют прочный и специфический комплекс даже с изолированной 5S рРНК (см. обзор [32]). В частности, для *E. coli* – это три белка, L5, L18 и L25 [18, 33]. Гомологи двух из них, L5 и L18, были обнаружены у представителей всех доменов жизни [5]. Гомологи третьего 5S рРНК-связывающего белка L25 *E. coli*, белки семейства СТС, оказались прерогативой бактерий [3–5]. Какие же структурные особенности белка СТС и 5S рРНК определяют специфичность их взаимодействия?

#### Е-ПЕТЛЯ – МЕСТО СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА СТС НА 5S рРНК

Место связывания белка L25 на 5S рРНК пытались определить неоднократно, используя различные методические подходы (см. обзоры [32, 34–36]). Наиболее точный результат был получен Доутвейтом с соавторами в 1979 г., которые установили, что рибосомный белок L25 специфически связывается с 40 нуклеотидным (69–87/90–110) фрагментом 5S рРНК (рис. 3А) и защищает его от гидролиза рибонуклеазами [37]. Позднее было показано, что другие белки семейства, такие как рибосомный белок TL5 *T. thermophilus*, основной стрессовый белок СТС *B. subtilis* и белки СТС *E. faecalis* и *Nostoc* sp., специфически связываются с тем же самым фрагментом 5S рРНК [13, 22, 24]. В состав данного фрагмента РНК входит уникальная внутренняя Е-петля. Как видно на рис. 3А, нуклеотидная последовательность Е-петли строго консервативна в бактериальных 5S рРНК [38]. В то же время нуклеотидная последовательность аналогичного участка 5S рРНК Архей и Эукариот имеет существенные отличия от Е-петли Бактерий [38, 39]. При этом белки семейства СТС способны формировать стабильные гибридные комплексы с разными бактериальными 5S рРНК [13, 18, 19], а белок L25 не связывается с 5S рРНК дрожжей [40]. Из этого следует, что строгая консервативность нуклеотидной последовательности в Е-петле 5S рРНК является

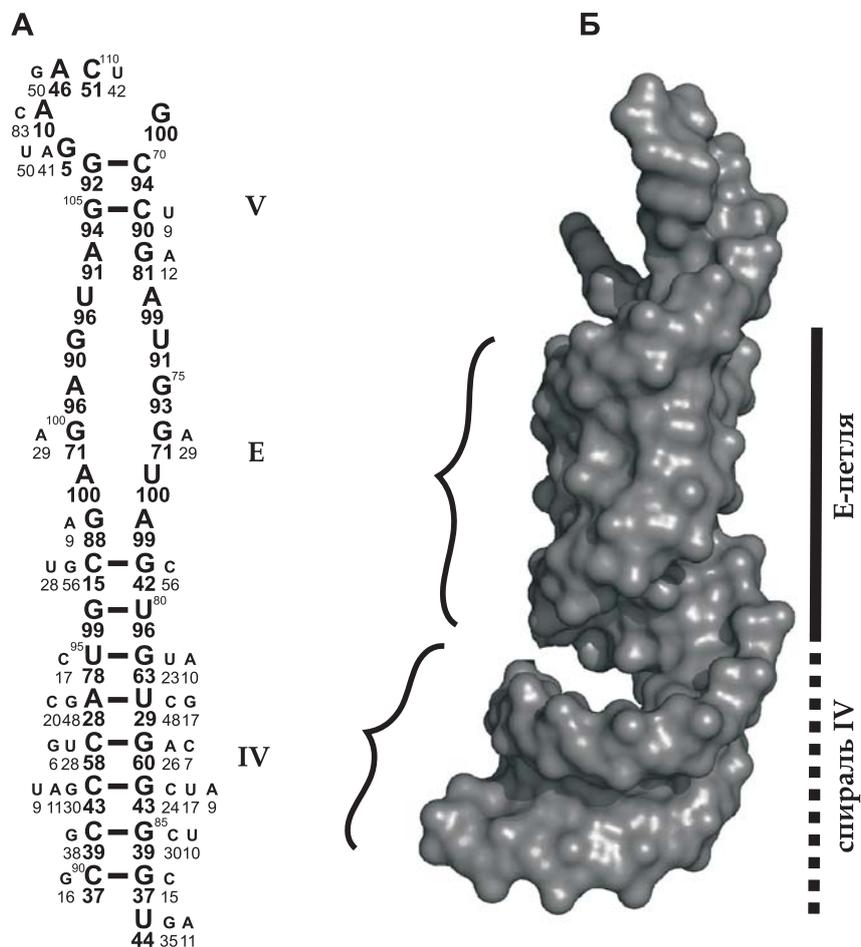


Рис. 3. Структура второго домена 5S рРНК *E. coli*.

А – схема вторичной структуры фрагмента 5S рРНК *E. coli*, защищаемого белком L25 от гидролиза рибонуклеазой А [37]. Петля и спирали указаны римскими буквами и цифрами, соответственно. Встречаемость нуклеотидов в соответствующих положениях 5S рРНК 460-ти изученных бактерий [38] указана в процентах под символом.

Б – пространственная структура этого же фрагмента 5S рРНК с указанием рельефа ее поверхности. Малые желобки двойной спирали отмечены фигурными скобками.

Для построения модели использована структура фрагмента 5S рРНК (PDB code: 364D).

необходимым условием для специфического взаимодействия с белками семейства СТС. Впоследствии, однако, было установлено, что уникальность Е-петли бактериальной 5S рРНК определяется не столько консервативностью ее нуклеотидного состава, сколько особенностью пространственной структуры [41, 42]. Название «Е-петля» для данного участка 5S рРНК было предложено еще в первых работах по изучению ее вторичной структуры [39, 43], исходя из того предположения, что из-за насыщенности обеих цепей пуринами в этой области не может формироваться двойная спираль. Однако оказалось, что стабильность пространственной структуры этого участка РНК поддерживается многочисленными внутримолекулярными связями, в том числе неканоническим спариванием нуклеотидов [42]. Эти внутримолекулярные взаимодействия приводят к образованию искаженной двойной спирали РНК, которая значительно отличается по своим параметрам от классической А-формы (рис. 3Б). Большой желобок этой двойной спирали становится более узким, а малый желобок более широким. Важную роль в стабилизации уникальной пространственной структуры РНК играют двухвалентные катионы и молекулы связанной воды. Авторами было выдвинуто предположение о том, что именно уникальная поверхность РНК является одним из основных условий специфического взаимодействия с белком [41]. В дальнейшем было показано, что уникальная пространственная структура Е-петли 5S рРНК не изменяется при взаимодействии с белком [29, 44]. При этом обнаруженная комплементарность взаимодействующих поверхностей РНК и белка [29] не оставляет сомнений в значимости уникальной структуры Е-петли для специфического контакта с белком семейства СТС.

#### МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В КОМПЛЕКСЕ СТС-5S рРНК

В период с 1999 по 2001 годы независимо несколькими группами были определены с высоким разрешением пространственные структуры двух белков семейства, L25 *E. coli* и TL5 *T. thermophilus*, в комплексе со специфическим фрагментом 5S рРНК [29, 44, 45]. Тогда же была определена пространственная структура еще одного представителя семейства, белка СТС *D. radiodurans*, в составе 50S рибосомной субчастицы с разрешением 3.1 Å [23]. Оказалось, что, несмотря на низкую гомологию первичных структур (см. главу II) данных белков, их пространственные структуры и способ взаимодействия с РНК очень сходны [23, 29] (рис. 4А). Структурные данные полностью подтвердили результаты биохимических экспериментов, полученных

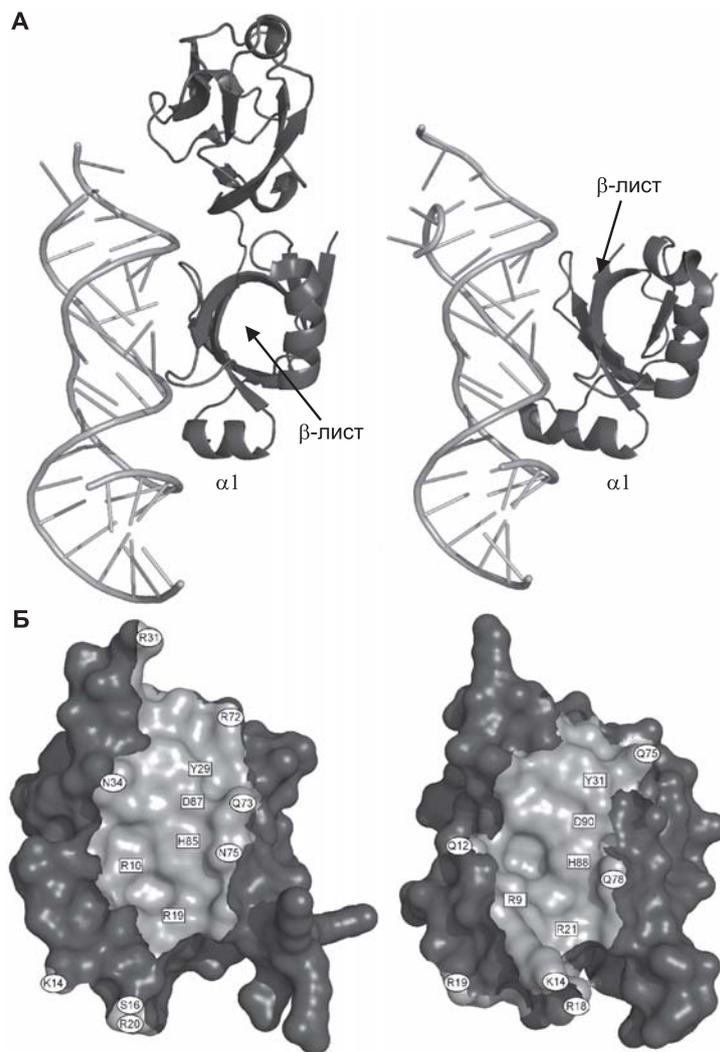


Рис. 4. А – модели пространственных структур белков TL5 (слева) и L25 (справа) в комплексе со специфическим фрагментом 5S рРНК. Отмечены структурные элементы белков, образующие контакт с РНК.

Б – область контакта белков TL5 (слева) и L25 (справа) с 5S рРНК. Контактующая область отмечена на поверхности белка светло-серым цветом. Положения консервативных и неконсервативных аминокислотных остатков, образующих с РНК водородные связи, указаны прямоугольниками и овалами, соответственно. Для построения моделей использованы структуры TL5-5S рРНК (PDB code: 1FEU) и L25-5S рРНК (PDB code: 1DFU).

ранее [22, 37]. Белок TL5 действительно взаимодействует с РНК только N-концевым доменом (рис. 4А), а все указанные белки связываются с одним и тем же участком 5S рРНК, E-петлей. Аминокислотные остатки одного из  $\beta$ -слоев белков СТС обеспечивают плотный контакт с сахарофосфатным остовом и основаниями малого желобка 5S рРНК в области E-петли, а остатки спирали  $\alpha 1$  и смежной петли  $\beta 1-\alpha 1$  взаимодействуют с сахарофосфатным остовом большого желобка РНК. Сравнительный анализ TL5–5S рРНК и L25–5S рРНК комплексов позволил выявить идентичные структурные элементы РНК и белков, участвующие в межмолекулярных контактах, которые, по-видимому, должны играть ключевую роль в специфическом взаимодействии данных макромолекул [25, 29]. Все аминокислотные остатки белков TL5 и L25, образующие водородные связи с РНК, условно были разделены на две группы – неконсервативные и консервативные [25]. Остатки первой группы располагаются по периферии контактирующей с РНК поверхности белка (рис. 4Б) и образуют доступные растворителю межмолекулярные водородные связи. Остатки второй группы (R9, R21, Y31, H88 и D90 для L25; R10, R19, Y29, H85 и D87 для TL5) расположены в центральной части контактирующей с РНК поверхности белка (рис. 4Б) и образуют межмолекулярные водородные связи, недоступные растворителю. Оказалось, что одновременная замена на аланин даже нескольких неконсервативных аминокислотных остатков в РНК-связывающем участке белка не приводит к существенному изменению стабильности комплекса TL5–5S рРНК [24]. Таким образом, исключение из межмолекулярных взаимодействий значительной части доступных растворителю водородных связей не влияет на формирование и стабильность комплекса. В то же время замена любого из пяти консервативных остатков РНК-связывающего участка как в TL5, так и в L25 приводит к сильной дестабилизации или полной невозможности образования комплекса [24, 25]. Был сделан вывод, что именно эти пять указанных выше остатков, формируют 5S рРНК-узнающий модуль в белках TL5 и L25. Недавно в работе Невской с соавторами, на основании анализа структур нескольких рибосомных РНК-белковых комплексов, было высказано предположение о том, что узнающие модули на поверхности взаимодействующих молекул должны формироваться их консервативными остатками, образующими консервативные водородные связи [46]. Этот предложенный принцип прекрасно подтверждается результатами, полученными для белков семейства СТС.

Как уже отмечалось в главе II, указанные выше пять аминокислотных остатков (два аргинина, тирозин, гистидин и аспаргат) строго

консервативны среди белков семейства СТС [25]. Поэтому логично было заключить, что РНК-узнающий модуль, обнаруженный в белках TL5 и L25, должен быть характерен для всех белков семейства СТС. Вероятно, такой РНК-узнающий модуль и характерен для подавляющего большинства белков семейства, но нет правил без исключений. При сравнительном анализе первичных структур трехсот представителей семейства СТС (таблица) было выявлено несколько случаев природных замен аминокислотных остатков РНК-узнающего модуля [25]. Так, консервативный аспаргат в белках СТС класса Bacilli был заменен на глутамат, а в белках типа Cyanobacteria – на серин или аланин. Такие изменения, искусственно внесенные в белки TL5 и L25 [24, 25], приводили к невозможности образования стабильного РНК-белкового комплекса. Можно было бы предположить, что белки СТС некоторых представителей класса Bacilli и типа Cyanobacteria утратили способность взаимодействовать с рибосомной 5S РНК, но при этом данные организмы сохранили ген, кодирующий такой белок. Однако это было бы непростительной расточительностью для бактериального организма. Оказалось, что указанные изменения в РНК-узнающем модуле белка сопровождаются определенными заменами и во взаимодействующем с СТС участке 5S рРНК соответствующего организма (рис. 5). Именно тот гуанин, азотистое основание которого взаимодействует с консервативным аспаргатом белков TL5 и L25, заменен на урацил в 5S рРНК *E. faecalis* (Bacilli). Увеличение размеров одного из взаимодействующих остатков сопровождается уменьшением размеров другого. Такие одновременные изменения в белке и РНК могли оказаться компенсаторными. Более сложная ситуация наблюдается в Е-петле 5S рРНК цианобактерий. Здесь изменениям подверглась почти половина нуклеотидов соответствующего участка (рис. 5). Однако, тот факт, что в указанных белках и РНК всех известных цианобактерий произошли сходные изменения, наводит на мысль, что эти изменения тоже могут носить компенсаторный характер. Ответ на данный вопрос был получен совсем недавно. Белки СТС и 5S рРНК из *E. faecalis* и *Nostoc* sp. были выделены и проверена их способность формировать специфические комплексы [24]. Оказалось, что только 5S рРНК и белок СТС из одного и того же организма способны формировать стабильный и специфический комплекс.

Суммируя приведенные выше данные, можно сделать несколько основных выводов. Во-первых, уникальная поверхность Е-петли, образованная искаженной двойной спиралью 5S рРНК, является необходимым условием для специфического взаимодействия с белком семейства СТС. Во-вторых, 5S рРНК-узнающий модуль, форми-

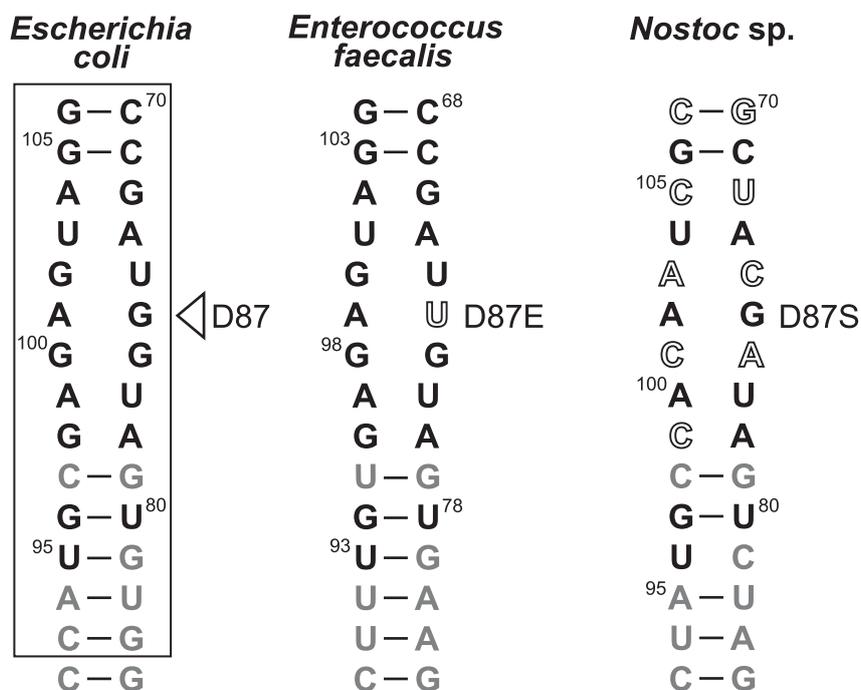


Рис. 5. Природные изменения в контактирующих областях некоторых 5S рРНК и белков СТС [25].

Представлены фрагменты 5S рРНК (спирали IV, V и E-петля) представителей *Bacillus* и *Cyanobacteria*. Для сравнения представлен соответствующий участок 5S рРНК *E. coli*. Непрерывной линией обведен участок РНК, контактирующий с белком. Строго консервативные в бактериальных 5S рРНК нуклеотиды (> 80%) показаны черным цветом, а неконсервативные (< 80%) – серым. Консервативные нуклеотиды, измененные в данных РНК, отмечены открытыми символами. Изменения консервативного Аспартата в соответствующем белке СТС указано справа от РНК.

руемый пятью строго консервативными остатками белков TL5 и L25, образующими недоступные растворителю водородные связи с РНК, характерен для большинства известных белков семейства СТС. В-третьих, одновременные изменения в области контакта белков СТС и 5S рРНК, произошедшие в этих молекулах в процессе эволюции некоторых групп бактерий, направлены на сохранение ими способности формировать стабильный комплекс.

#### IV. БЕЛОК СТС В РИБОСОМЕ

Из материала предыдущих глав обзора, следует, что, во-первых, в подавляющем большинстве известных бактериальных организмов присутствует белок семейства СТС, присущий только бактериям. Во-вторых, этот белок способен специфически связываться с 5S рРНК и постоянно или временно находится в составе рибосом. В связи с этим возникают вопросы: для чего белок семейства СТС появился в Бактериях и до сих пор сохранен большинством из них, а также, какую роль он играет в функционировании рибосомы? По-видимому, сегодня на эти вопросы можно ответить только частично, что мы попытаемся сделать в последующих разделах обзора.

##### ПОЛОЖЕНИЕ 5S рРНК–БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА В РИБОСОМЕ

Положение белка L25, так же как и других компонентов 5S рРНК-белкового комплекса, в рибосоме было установлено довольно давно. В начале 80-х годов, методами иммунной электронной микроскопии, было показано, что 5S рРНК расположена в центральном протуберанце 50S рибосомной субчастицы *E. coli* [47–49]. Было показано, что торцевая С-петля находится почти на вершине протуберанца, а 3'-5' концевая спираль посередине протуберанца, со стороны, противоположной интерфейсу. Несколько позже, в том же районе 50S субчастицы были локализованы и все три 5S рРНК-связывающих белка [50, 51]. Белок L25 расположен у основания центрального протуберанца 50S рибосомной субчастицы со стороны L7/L12 выступа (рис. 6А). Белки L5 и L18 были помещены почти у вершины центрального протуберанца со стороны L1 выступа. 5S рРНК состоит из двух доменов (шпилек), расположенных вдоль основной оси молекулы [23, 52–54]. Первый домен молекулы 5S рРНК содержит спирали 2 и 3, петли В и С,

Рис. 6. А – положение 5S рРНК-белкового комплекса в 50S рибосомной субчастице *E. coli*. Контурный рисунок 50S субчастицы (сторона, контактирующая с 30S субчастицей) построен на основании данных электронной микроскопии [34, 47, 48]. Модель пространственной структуры 5S рРНК-белкового комплекса представлена ленточной моделью. Для построения этой модели использована структура 50S субчастицы (PDB code: 2AW4) рибосом *E. coli*. Положение белков 5S рРНК-белкового комплекса указано стрелками. →

Б – схема, иллюстрирующая химические сшивки между участками 5S рРНК (D-петля и спирали II, III) и 23S рРНК (домены II и V), построена на основании данных из работ [35, 56–59]. Спирали и петли 5S рРНК отмечены римскими цифрами и буквами, соответственно. Спирали 23S рРНК отмечены арабскими цифрами. Указаны участки 23S рРНК, принимающие участие в формировании функциональных центров рибосомы: PTR (peptidyltransferase ring) – элемент пептидил-трансферазного центра и GAC (GTPase-associated center).

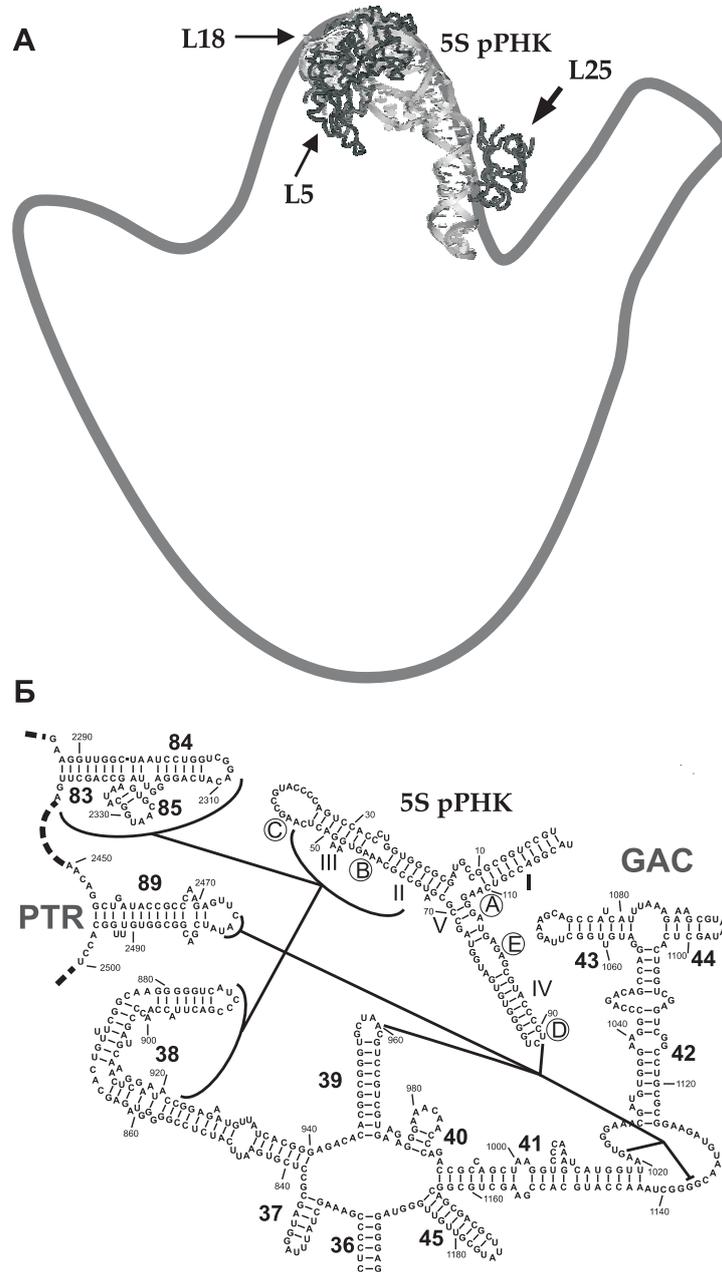


Рис. 6. Подпись к рисунку дана на предыдущей странице.

а второй домен – спирали 4 и 5, петли D и E [39, 55]. В дальнейшем, использование метода межмолекулярных сшивок позволило уточнить положение в рибосоме 5S рРНК (ее структурных элементов) и специфически связывающихся с ней белков (рис. 6Б). Так, было показано, что нуклеотид U89 D-петли 5S рРНК (второй домен) сшивается с нуклеотидами домена II (U958, A960, G1022 и G1138) и домена V (C2475, U2477) 23S рРНК [56–58]. Кроме того, несколько нуклеотидов спиралей II и III 5S рРНК (первый домен) сшивались с участками домена II (спирали 38) и домена V (спирали 83–85) 23S рРНК [59]. Рибосомных белков (не считая белков 5S рРНК–белкового комплекса), которые бы сшивались с 5S рРНК в рибосоме, обнаружено не было [60]. В то же время белки L5 и L18, взаимодействующие с первым доменом 5S рРНК [23, 61], сшивались с участком домена V (спирали 84 и 85) 23S рРНК [60]. Единственная молекула, с которой сшивался белок L25 в рибосоме – это 5S рРНК [62]. Таким образом, основными соседями 5S рРНК в 50S рибосомной субчастице, которые обнаруживались указанным методом, являются II и V домены 23S рРНК и белки L5, L18 и L25. Эти данные позволяют заключить, что в отличие от 5S рРНК, которая имеет много близкорасположенных участков 23S рРНК, положение белка L25 в рибосоме достаточно обособленно. Определенным подтверждением этого заключения могут служить результаты реконструкции *in vitro* 5S рРНК–белкового комплекса и 50S рибосомных субчастиц *E. coli*. Во-первых, было показано, что белок L25 связывается с 5S рРНК независимо от других белков [63]. Во-вторых, 5S рРНК–белковый комплекс формируется до своего встраивания в рибосомную субчастицу [64, 65]. За последние шесть лет были определены пространственные структуры 50S рибосомных субчастиц из трех бактерий: *D. radiodurans*, *E. coli* и *T. thermophilus* [23, 53, 54]. Это позволило нам провести анализ межмолекулярных контактов белка СТС и 5S рРНК в рибосоме, а также сравнить эти контакты в разных бактериальных рибосомах. Большая часть приведенных выше данных по межмолекулярным сшивкам подтверждается результатами кристаллографических исследований. Хотелось бы обратить особое внимание на некоторые межмолекулярные контакты белка СТС и 5S рРНК в рибосоме, которые могут быть выявлены благодаря кристаллографическим исследованиям (рис. 7–8). Как было уже сказано ранее, одна из сторон E-петли 5S рРНК взаимодействует с белком L25. В то же время противоположная сторона E-петли, а не спирали II и III 5S рРНК [59], образует плотный контакт со спиралью 38 23S рРНК (рис. 7А). Из этого следует, что второй домен 5S рРНК в районе E-петли оказывается как бы «зажат»

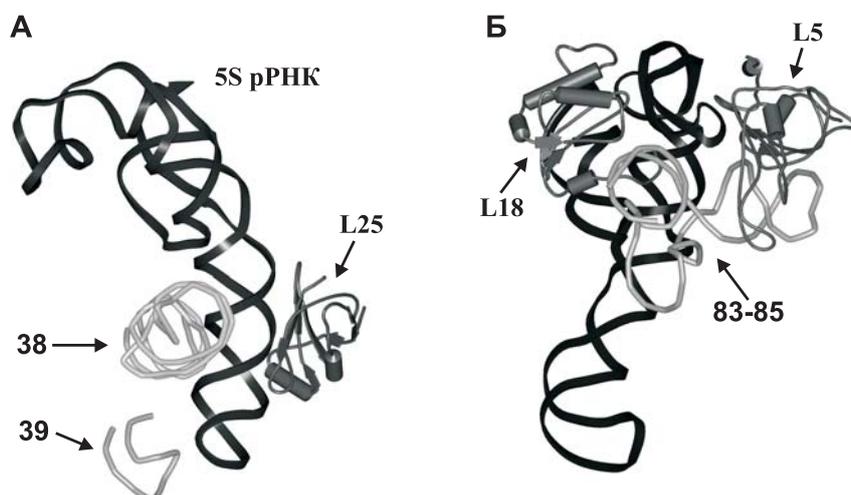


Рис. 7. Модели, иллюстрирующие взаимное расположение 5S рРНК-белкового комплекса и некоторых участков 23S рРНК в рибосоме *E. coli*. Для построения моделей была использована структура 50S субчастицы (PDB code: 2AW4) рибосом *E. coli*.

А – 5S рРНК, белок L25 и спирали 38 и 39 23S рРНК.

Б – 5S рРНК, белки L5, L18 и спирали 83–85 23S рРНК. Положение белков и рРНК указано стрелками.

между белком СТС и спиралью 23S рРНК. Другой обширный межмолекулярный контакт приходится на первый домен 5S рРНК и спирали 83–85 23S рРНК. Это взаимодействие осуществляется через белки L5 и L18 (рис. 7Б). Таким образом, две группы указанных выше межмолекулярных контактов 5S рРНК, отмеченные ранее для рибосомы археи *Haloarcula marismortui* [52, 66, 67], оказываются консервативны и для бактериальных рибосом (*D. radiodurans*, *E. coli* и *T. thermophilus*). Еще один консервативный, хотя и одиночный контакт 5S рРНК и 23S рРНК, оказался характерным для всех изученных рибосом (рис. 7А). Консервативный выпетленный урацил спирали 39 23S рРНК образует водородную связь с D-петлей 5S рРНК. Других консервативных межмолекулярных контактов 5S рРНК в рибосоме пока не обнаруживается. Поэтому можно предположить, что именно указанные консервативные межмолекулярные контакты определяют уникальное положение 5S рРНК в рибосоме. Эти результаты подтверждают предположение, о том, что 5S рРНК может являться связующим звеном между II и V доменами 23S

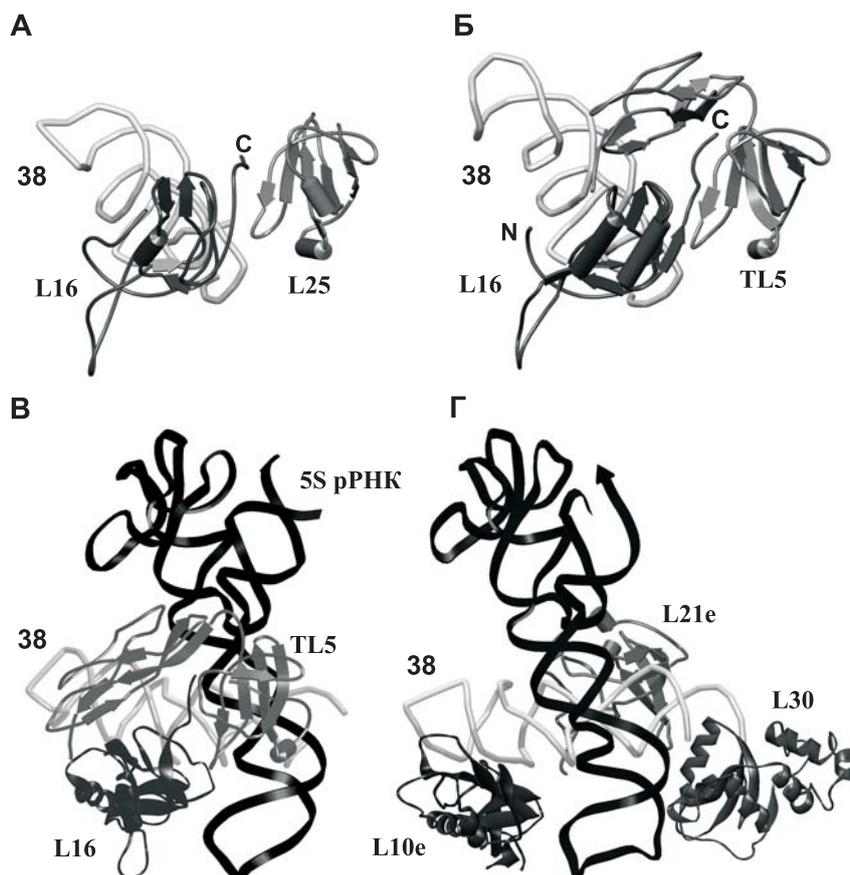


Рис. 8. Модели, иллюстрирующие взаимное расположение белка L16 (его архейного гомолога L10e) и других компонентов рибосом *E. coli* (А), *T. thermophilus* (Б и В) и *H. marismortui* (Г).

Для построения моделей были использованы структуры 50S субчастицы рибосом: *E. coli* (PDB code: 2AW4), *T. thermophilus* (PDB code: 2J01) и *H. marismortui* (PDB code: 1JJ2). Положение рибосомных белков, 5S рРНК, спирали 38 23S рРНК, «N» и «C» концов белка L16 отмечены на рисунке.

рРНК [35]. В дополнение к сказанному хотелось бы отметить межмолекулярные контакты еще одного рибосомного белка в интересующей нас области 50S субчастицы, которые оказались консервативными в бактериальных и архейной рибосомах. Еще в ранних работах белок L16 (в Археях – L10e) был причислен к ключевым белкам рибосомы. Большая рибосомная субчастица в отсутствие этого

белка обнаруживала дефекты в пептидил-трансферазной активности [68, 69] и связывании аминоксил-тРНК [70]. Результаты последних структурных исследований рибосом свидетельствуют о многочисленных межмолекулярных контактах белка L16 с рибосомной РНК [53, 54, 67, 71, 72]. В частности, белок L16 (L10e) образует плотный контакт со спиралью 38 23S рРНК (рис. 8). Кроме того, были отмечены единичные контакты этого белка со спиралью IV 5S рРНК в бактериальных и архейных рибосомах [52, 67, 73]. Мы к этому можем добавить, что в бактериальных рибосомах С-концевой участок белка L16 взаимодействует с белком СТС. Причем взаимодействие с белком TL5 осуществляется с двумя доменами, что значительно увеличивает область контакта по сравнению с однодоменным белком L25 (рис. 8А, Б). При этом второй домен белка TL5 образует еще несколько водородных связей со спиралью 38 (рис. 8Б). Таким образом, одной из возможных функций бактериального белка СТС может быть дополнительная фиксация (стабилизация) контактов между 5S рРНК, спиралью 38 23S рРНК и белком L16 (рис. 8В). К сказанному хотелось бы добавить, что в архейной рибосоме, в которой нет белка СТС, дополнительная фиксация спирали 38 23S рРНК с 5S рРНК [52, 67] осуществляется по альтернативному сценарию (рис. 8Г). В данной рибосоме это делают белки L30 (архейный белок L30 в два раза больше по размеру своего бактериального гомолога, который не взаимодействует с 5S рРНК) и L21e (этот белок – эволюционное приобретение архей и эукариот [5]).

#### БЕЛОК СТС И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ РИБОСОМЫ

Вопрос о необходимости отдельных компонентов рибосомы для ее функционирования возник одновременно с самой темой биосинтеза белка. Решить этот вопрос пытались, используя различные методические подходы – идентификацию рибосомных белков и участков рРНК, взаимодействующих с компонентами белок-синтезирующей системы (тРНК, мРНК, белковые факторы трансляции и др.) и выявление изменений в функциональных свойствах рибосомы, лишенной одного из своих компонентов. Среди рибосомных белков и РНК, образующих контакты с компонентами аппарата трансляции, 5S рРНК и белок L25 не были обнаружены [54, 74–85]. На основании этих данных можно сделать вывод, что 5S рРНК и белок L25 (5S рРНК-связывающий домен белка СТС) не взаимодействуют непосредственно с компонентами аппарата трансляции. В то же время отсутствие 5S рРНК-белкового комплекса при сборке 50S субчастицы *E. coli in vitro* приводило к драматическим последствиям [65, 86]. Такая рибосомная субчастица обладала основными

морфологическими чертами интактной 50S субчастицы, была способна ассоциировать в рибосому [87] и расщеплять ГТФ [65]. Однако 50S субчастица, лишенная 5S рРНК-белкового комплекса, была не способна синтезировать природный или искусственный полипептид *in vitro* [65, 86]. При удалении из бактериальной хромосомы части генов 5S рРНК наблюдалось значительное замедление роста клеток [88, 89]. Был сделан вывод, что 5S рРНК строго необходима для функционирования рибосомы. Что же касается необходимости индивидуальных 5S рРНК-связывающих белков в сборке функционально активной бактериальной рибосомы, то до недавнего времени однозначного ответа на этот вопрос получено не было. Среди десятков изученных спонтанных мутантов, лишенных 1–2 рибосомных белков, не найдено таких, которые бы не содержали 5S рРНК-связывающий белок [90]. Эти данные позволяли думать, что 5S рРНК-связывающие белки также безусловно необходимы для сборки и функционирования рибосомы. Однако до недавнего времени отсутствовали прямые доказательства этого предположения.

В 2007 г. нами было показано, что рибосомные белки L5 и L18 являются строго необходимыми для выживания клеток *E. coli* [91]. Нокаут генов этих белков в хромосоме *E. coli* был летален для клеток. Эти результаты согласуются с данными о том, что рибосомные белки L5 и L18 необходимы для встраивания 5S рРНК в рибосомную субчастицу при реконструкции *in vitro* [92]. В то же время оказалось, что при нокауте гена рибосомного белка L25 клетки *E. coli* выживают, но растут медленнее, чем клетки родительского штамма [91].  $\Delta$ L25 рибосомы могли синтезировать природные полипептиды в системах *in vivo* и *in vitro*, однако общее количество синтезированного ими продукта было меньше, чем контрольными рибосомами. По-видимому, это различие и служит причиной медленного роста клеток  $\Delta$ L25 штамма. Таким образом, белок L25 не являясь необходимым для выживания клеток *E. coli*, тем не менее бесспорно важен для обеспечения нормальной работы аппарата трансляции. При этом рост клеток мутантного штамма восстанавливался при экспрессии гена белка L25 или его гомолога (белка СТС *B. subtilis*) с плазмиды [91]. Рибосомы  $\Delta$ L25 штамма, лишенные только белка семейства СТС, после встраивания этого белка в рибосому *in vivo* восстанавливают свои свойства.

Хотя до сих пор нет прямых доказательств участия белка СТС в конкретном этапе трансляции, однако совокупность представленных в этой главе данных позволяет высказать по этому поводу некоторые предположения. С одной стороны, белок СТС образует консерватив-

ные контакты с 5S рРНК и белком L16, а дополнительные домены белков TL5 *T. thermophilus* и СТС *D. radiodurans* образуют контакт со спиралью 38 23S рРНК. С другой стороны, из результатов кристаллографических исследований следует, что упомянутые выше молекулы (белки L5, L16 и спираль 38 23S рРНК), непосредственно взаимодействующие с 5S рРНК, контактируют с тРНК в А- или Р-сайтах [53, 54, 71, 72, 93]. Поэтому, учитывая межмолекулярные контакты белка СТС в рибосоме, можно предположить, что он участвует в стабилизации и нормальной работе этих функциональных центров рибосомной 50S субчастицы бактерий. Аналогичное предположение было высказано Хармсом с соавторами [23], которые обнаружили, что средний домен белка СТС *D. radiodurans* взаимодействует со спиралью 38 23S рРНК, а С-конец белка «дотягивается» до А-сайта рибосомной 50S субчастицы. В связи со сказанным выше, хотелось бы еще раз обратиться к работам группы А.А.Богданова [35, 56–58]. На основании результатов межмолекулярных сшивок 5S рРНК с доменом II (центр, ассоциированный с ГТФазной активностью, GAC) и доменом V (пептидил-трансферазный центр, РТС), авторы предположили, что 5S рРНК может являться посредником между этими функциональными центрами рибосомы. Учитывая положение 5S рРНК в рибосоме и ее межмолекулярные контакты, выявленные в последних кристаллографических исследованиях [53, 54, 71, 72, 93], мы предполагаем, что 5S рРНК может являться также координатором между двумя тРНК-связывающими участками (А- и Р-сайтами) рибосомной 50S субчастицы.

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В завершение обзора хотелось бы сформулировать основные выводы и сказать несколько слов о перспективах дальнейших исследований в этой области. Во-первых, мы считаем очевидным, что главной мишенью белков СТС, появившихся у бактерий довольно давно, является рибосомная 5S РНК. Это указывает на то, что данный белок необходим для эффективной работы аппарата трансляции бактерий. В то же время некоторые известные примеры так называемой «регрессивной эволюции» белков данного семейства у Бактерий, а также отсутствие их у Архей и Эукариот, наводят на мысль о существовании альтернативного пути решения той задачи, которая в большинстве бактерий возложена на белок СТС. Во-вторых, положение белка СТС в рибосоме и его межмолекулярные контакты позволяют предположить, что одной из возможных функций этого

белка является стабилизация важного «структурного узла», имеющего непосредственное отношение к работе А- и Р-сайтов. Конечно, существует еще целый ряд нерешенных вопросов о роли белка СТС в жизнедеятельности бактериальной клетки. Некоторые из них нами были затронуты в обзоре. Например, неизвестно какую роль играют дополнительные домены белка СТС в работе аппарата трансляции бактерий и почему некоторые организмы от них отказались. Какую особую функцию выполняет белок СТС в рибосомах *B. subtilis* во время стресса или на ранних стадиях образования спор? Учитывая уже накопленный на сегодняшний день экспериментальный материал и новые методические возможности исследователей, которые появились в последние годы, можно быть уверенным в том, что в ближайшее время будут получены ответы на эти, а также другие вопросы, связанные с ролью белка СТС в функционировании бактериального аппарата трансляции. Наконец, хотелось бы уделить еще несколько строк проблеме возможного использования накопленных знаний о белках семейства СТС в прикладных целях. Как уже было сказано, белки семейства СТС присущи только домену Bacteria, и главной мишенью для них является строго консервативная Е-петля рибосомной 5S РНК. При этом нокаут гена рибосомного белка L25 приводит к значительному замедлению роста клеток. Поэтому, логично было бы использовать в качестве специфических клеточных мишеней для нового типа антибактериальных агентов либо сами белки СТС, либо их специфическое место связывания на 5S рРНК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J.C., Moras, D., Poch, O.* (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 5382–5390.
2. *Gryaznova, O.I., Davydova, N.L., Gongadze, G.M., Jonsson, B.H., Garber, M.B., Liljas, A.* (1996) *Biochimie*, **78**, 915–919.
3. *Benson, D.A., Karsch-Mizrashi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 16–20.
4. *Frishman, D., Mokejcs, M., Kosykh, D., Kostenmüller, G., Kolesov, G., Zubrzycki, I., Gruber, C., Geier, B., Kaps, A., Albermann, K., Volz, A., Wagner, C., Fellenberg, M., Heumann, K., Mewes, H.W.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 207–211.
5. *Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3784–3788.
6. *Haldenwang, W.G., Losick, R.* (1979) *Nature*, **282**, 256–260.
7. *Haldenwang, W.G., Losick, R.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7000–7004.
8. *Moran, C.P. Jh., Lang, N., Banner, C.D., Haldenwang, W.G., Losick, R.* (1981) *Cell*, **25**, 783–791.
9. *Moran, C.P. Jh., Lang, N., Losick, R.* (1981) *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5979–5990.
10. *Haldenwang, W.G.* (1995) *Microbiol. Rev.*, **59**, 1–30.

11. *Völker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Völker, A., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M.* (1994) *Microbiology*, **140**, 741–752.
12. *Hecker, M., Völker, U.* (1990) *FEMS Microbiology Ecology*, **74**, 197–214.
13. *Корепанов А.П., Гонгадзе Г.М., Гарбер М.Б.* (2004) *Биохимия*, **69**, 749–754.
14. *Schmalisch, M., Langbein, I., Stülke, J.* (2002) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 495–501.
15. *Duche, O., Tremoulet, F., Glaser, P., Labadie, J.* (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1491–1498.
16. *Kazmierczak, M.G., Mithoe, S.C., Boor, K.J., Wiedmann, M.* (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 5722–5734.
17. *Truitt, C.L., Weaver, E.A., Haldenwang, W.G.* (1988) *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 166–171.
18. *Horne, J.R., Erdmann, V.A.* (1972) *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 337–344.
19. *Gongadze, G.M., Tishchenko, S.V., Sedelnikova, S.E., Garber, M.B.* (1993) *FEBS Lett.*, **330**, 46–48.
20. *Dovgas, N.V., Markova, L.F., Mednikova, T.A., Vinokurov, L.M., Alakhov, Y.B., Ovchinnikov, Y.A.* (1975) *FEBS Lett.*, **53**, 351–354.
21. *Igo, M., Lampe, M., Losick, R.* (1988) *Genetics and biotechnology of bacilli*. / Eds. Ganesan, A.T., Hoch, J.A.. Academic Press, San Diego, Calif., **2**, 151–156.
22. *Gongadze, G.M., Meshcheryakov, V.A., Serganov, A.A., Fomenkova, N.P., Mudrik, E.S., Jonsson, B.-H., Liljas, A., Nikonov, S.V., Garber, M.B.* (1999) *FEBS Lett.*, **451**, 51–55.
23. *Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., Yonath, A.* (2001) *Cell*, **107**, 679–688.
24. *Коробейникова А.В., Гонгадзе Г.М., Корепанов А.П., Елисеев Б.Д., Баженова М.В., Гарбер М.Б.* (2008) *Биохимия*, **73**, 193–201.
25. *Gongadze, G.M., Korepanov, A.P., Stolboushkina, E.A., Zelinskaya, N.V., Korobeinikova, A.V., Ruzanov, M.V., Eliseev, B.D., Nikonov, O.S., Nikonov, S.V., Garber, M.B., Lim, V.I.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 16151–16156.
26. *Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olsen, G.J., Swanson, R.V.* (1998) *Nature*, **392**, 353–358.
27. *Newberry, V., Garrett, R.A.* (1980) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4131–4142.
28. *Stoldt, M., Wöhnert, J., Görlach, M., Brown, L.R.* (1998) *EMBO J.*, **17**, 6377–6384.
29. *Fedorov, R., Meshcheryakov, V., Gongadze, G., Fomenkova, N., Nevskaya, N., Selmer, M., Laurberg, M., Kristensen, O., Al-Karadaghi, S., Liljas, A., Garber, M., Nikonov, S.* (2001) *Acta Crystallogr. D*, **57**, 968–976.
30. *Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.* (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680.
31. *Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3497–3500.
32. *Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A., Barciszewski, J.* (1996) *Biol. Rev. Camb. Phylos. Soc.*, **71**, 1–25.
33. *Chen-Schmeisser, U., Garrett, R.A.* (1977) *FEBS Lett.*, **74**, 287–291.
34. *Stöffler, G., Stöffler-Meilicke, M.* (1984) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13**, 303–330.
35. *Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A., Dokudovskaya, S.S., Lavrik, I.N.* (1995) *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 869–876.

36. Moore, P.B. (1996) Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis. / Eds. Zimmermann R., Dahlberg A. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo. FL, 199–236.
37. Douthwaite, S., Garrett, R.A., Wagner, R., Feunteun, J. (1979) *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2453–2470.
38. Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A., Barciszewska, J. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 176–178.
39. Kjems, J., Olesen, S.O., Garrett, R.A. (1985) *Biochemistry*, **24**, 241–250.
40. Wrede, P., Erdmann, V.A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2706–2709.
41. Dallas, A., Moore, P.B. (1997) *Structure*, **5**, 1639–1653.
42. Correll, C.C., Freeborn, B., Moore, P.B., Steitz, T.A. (1997) *Cell*, **91**, 705–712.
43. MacKey, R.M., Spencer, D.F., Schnare, M.N., Doolittle, W.F., Gray, M.W. (1982) *Can. J. Biochem.*, **60**, 480–489.
44. Lu, M., Steitz, T.A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2023–2028.
45. Stoldt, M., Wöhnert, J., Ohlenschläger, O., Görlach, M., Brown, L.R. (1999) *EMBO J.*, **18**, 6508–6521.
46. Невская Н.А., Никонов О.С., Ревтович С.В., Гарбер М.Б., Никонов С.В. (2004) *Молекулярная биология*, **38**, 926–936.
47. Shatsky, I.N., Evstafieva, A.G., Bystrova, T.F., Bogdanov, A.A., Vasiliev, V.D. (1980) *FEBS Lett.*, **121**, 97–100.
48. Stöffler-Meilicke, M., Stöffler, G., Odom, O.W., Zinn, A., Kramer, G., Hardesty, B. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5538–5542.
49. Evstafieva, A.G., Shatsky, I.N., Bogdanov, A.A., Vasiliev, V.D. (1982) *FEBS Lett.*, **185**, 57–62.
50. Stöffler-Meilicke, M., Noah, M., Stöffler, G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6780–6784.
51. Lotti, M., Noah, M., Stöffler-Meilicke, M., Stöffler, G. (1989) *Mol. Gen. Genet.*, **216**, 245–253.
52. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 905–920.
53. Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sunjurjo, A., Holton, J.M., Cate, J.H. (2005) *Science*, **310**, 827–834.
54. Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy F.V. IV, Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A.C., Weir, J.R., Ramakrishnan, V. (2006) *Science*, **313**, 1935–1942.
55. Christiansen, J., Douthwaite, S.R., Christiansen, A., Garrett, R.A. (1985) *EMBO J.*, **4**, 1019–1024.
56. Dontsova, O., Tishkov, V., Dokudovskaya, S., Bogdanov, A., Döring, T., Rinke-Appel, J., Thamm, S., Greuer, B., Brimacombe, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4125–4129.
57. Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Shpanchenko, O., Bogdanov, A., Brimacombe, R. (1996) *RNA*, **2**, 146–152.
58. Sergiev, P., Dokudovskaya, S., Romanova, E., Topin, A., Bogdanov, A., Brimacombe, R., Dontsova, O. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2519–2525.
59. Osswald, M., Brimacombe, R. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2283–2290.
60. Osswald, M., Greuer, B., Brimacombe, R. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6755–6760.
61. Гонгадзе Г.М., Передерина А.А., Мецержяков В.А., Федоров Р.В., Москаленко С.Е., Рак А. В., Серганов А.А., Щербаков Д.В., Никонов С.В., Гарбер М.Б. (2001) *Молекулярная биология*, **35**, 610–616.

62. Szymkowiak, C., Wagner, R. (1985) *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3953–3968.
63. Spierer, P., Zimmermann, R.A. (1978) *Biochemistry*, **17**, 2474–2479.
64. Nierhaus, K.H., Dohme, F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4713–4717.
65. Dohme, F., Nierhaus, K.H. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2221–2225.
66. Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4899–4903.
67. Klein, D.J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 141–177.
68. Moore, V.G., Atchison, R.E., Thomas, G., Moran, M., Noller, H.F. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 844–848.
69. Hampl, H., Schulze, H., Nierhaus, K.H. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 2284–2288.
70. Kazemie, M. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**, 373–378.
71. Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucorn, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., Noller, H.F. (2001) *Science*, **292**, 883–896.
72. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 920–930.
73. Nishimura, M., Yoshida, T., Shirouzu, M., Terada, T., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Ohkudo, T., Kobayashi, Y. (2004) *J. Mol. Biol.*, **344**, 1369–1383.
74. Stark, H., Rodnina, M.V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W., van Heel, M. (1997) *Nature*, **389**, 403–406.
75. Wilson, K.S., Noller, H.F. (1998) *Cell*, **92**, 131–139.
76. Wilson, K.S., Ito, K., Noller H.F., Nakamura, Y. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 866–870.
77. Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., Zemlin, F., Wintermeyer, W., van Heel, M. (2002) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **9**, 849–854.
78. Lancaster, L., Kiel, M.C., Kaji, A., Noller, H.F. (2002) *Cell*, **111**, 129–140.
79. Marzi, S., Knight, W., Brandi, L., Caserta, E., Soboleva, N., Hill, W.E., Gualerzi, C.O., Lodmell, J.S. (2003) *RNA*, **9**, 958–969.
80. Klaholz, B.P., Myasnikov, A.G., van Heel, M. (2004) *Nature*, **427**, 862–865.
81. Wilson, K.S., Nechifor, R. (2004) *J. Mol. Biol.*, **337**, 15–30.
82. Scarlett, D.-J.G., McCaughan, K.K., Wilson, D.N., Tate, W.P. (2005) *J. Biol. Chem.*, **278**, 15095–15104.
83. Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Yoshida, T., Ohkubo, T., Albrecht, R., Buerger, J., Kobayashi, Y., Fucini, P. (2005) *EMBO J.*, **24**, 251–260.
84. Petry, S., Brodersen, D.E., Murphy IV F.V., Dunham, C.M., Selmer, M., Tarry, M.J., Kelley, A.C., Ramakrishnan, V. (2005) *Cell*, **123**, 1255–1266.
85. Weixlbaumer, A., Petry, S., Dunham, C.M., Selmer, M., Kelley, A.C., Ramakrishnan, V. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 733–737.
86. Erdmann, V.A., Fahnestock, S., Higo, K., Nomura, M. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2932–2936.
87. Selivanova, O.M., Gongadze, G.M., Gudkov, A.T., Vasiliev, V.D. (1986) *FEBS Lett.*, **197**, 79–83.
88. Ammons, D., Rampersad, J., Fox, G.E. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 637–642.
89. Ammons, D., Rampersad, J. (2001) *Curr. Microbiol.*, **43**, 89–92.
90. Dabbs, E.R. (1991) *Biochimie*, **73**, 639–645.
91. Korepanov, A.P., Gongadze, G.M., Garber, M.B., Court, D.L., Bubu-

- 
- nenko, M.G.* (2007) *J. Mol. Biol.*, **366**, 1199–1208.
92. *Röhl, R., Nierhaus, K.H.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 729–733.
93. *Bashan, A., Agmon, I., Zarivach, R., Schluenzen, F., Harms, J., Berisio, R., Bartels, H., Franceschi, F., Auerbach, T., Hansen, H.A.S., Kossoy, E., Kessler, M., Yonath, A.* (2003) *Mol. Cell*, **11**, 91–102.