

# ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ 5S рРНК, ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МАКРОМОЛЕКУЛАМИ И ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ

©2008 г. А. В. СМИРНОВ<sup>1,2</sup>, Н. С. ЭНТЕЛИС<sup>2</sup>,  
И. А. КРАШЕНИННИКОВ<sup>2</sup>, Р. МАРТЭН<sup>2</sup>,  
И. А. ТАРАСОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Université Louis Pasteur, Страсбург, Франция.

I. Введение. II. Общие сведения о 5S рРНК. III. Особенности структуры. IV. Взаимодействия с биологическими макромолекулами. V. Функции 5S рРНК. VI. Импорт 5S рРНК в митохондрии клеток млекопитающих. VII. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Малые некодирующие РНК привлекают внимание исследователей как сохранившиеся до нашего времени представители гипотетического «мира РНК», который, по-видимому, предшествовал современному этапу эволюции жизни на Земле. Среди малых РНК особый интерес представляет 5S рРНК. Она является компонентом рибосом всех живых организмов, за исключением рибосом митохондрий грибов и животных, и взаимодействует с разнообразными белковыми факторами, а также с 23S (28S) рРНК. Предполагают, что 5S рРНК должна играть важную роль в процессе синтеза белка на рибосоме. Вместе с тем, несмотря на обилие данных о структуре и взаимодействиях 5S рРНК с другими биологическими макромолекулами, ее функция остается невыясненной.

За более чем тридцатилетнюю историю изучения 5S рРНК стала классическим модельным объектом в исследованиях структуры и динамики РНК в растворе и в составе комплексов с белками, про-

---

Адрес для корреспонденции: skard1@yandex.ru (А. В. Смирнов).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 03-04-22001-НЦНИ\_а.

цесса РНК-белкового распознавания и связывания. Весьма интригующим стало открытие импорта 5S рРНК эукариотического типа в митохондрии позвоночных, хотя механизм этого переноса до сих пор не ясен. Загадочна и роль эукариотической 5S рРНК в прокариотической системе митохондрий. Настоящий обзор посвящен рассмотрению особенностей структуры 5S рРНК в контексте ее взаимодействий с разнообразными факторами и выполняемых ею функций.

## II. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О 5S РРНК

5S рРНК представляет собой сравнительно небольшую РНК-молекулу (~120 нуклеотидов) с высоко консервативными вторичной и третичной структурами, хотя ее нуклеотидная последовательность может варьировать даже в пределах одного вида (так, в геноме человека закодированы 13 аллельных вариантов 5S рРНК [1]). Молекулы 5S рРНК как прокариот, так и эукариот имеют трехдоменную Y-образную организацию, получившую название «вилочки» (wishbone) [2–4]. Каждая «ветвь» молекулы представляет собой высоко структурированную систему спиралей, терминальных и внутренних петель с непрерывным или почти непрерывным стэкингом (рис. 1а, б). По современной номенклатуре двуцепочечные участки 5S рРНК принято обозначать римскими цифрами, а внутренние и терминальные петли – латинскими буквами. Устоявшихся обозначений для отдельных доменов нет, однако в некоторых случаях для этих целей используют греческие буквы. Так,  $\alpha$ -домен образован спиралью I,  $\beta$ -домен – спиралью II и III и петлями В и С, а домен  $\gamma$  включает в себя спирали IV и V и петли D и E.

В зависимости от особенностей строения каждого домена, и в первую очередь домена  $\gamma$ , все 5S рРНК можно отнести либо к бактериальному, либо к эукариотическому типу. Как правило, 5S рРНК органелл обладают классической бактериальной организацией, а 5S рРНК архей больше напоминают эукариотические, что также свидетельствует об общности происхождения этих групп организмов [5].

Соответствующие домены разных 5S рРНК обычно имеют весьма сходную пространственную организацию, представляя собой более или менее искаженные спирали. С точки зрения укладки они практически независимы друг от друга и составляют отдельные структурные единицы. Специальным структурным модулем, объединяющим их в единую молекулу, является петля А. Она играет центральную роль в третичной структуре 5S рРНК. Организованная как трехосевое соединение, петля А определяет взаимное расположение доменов



молекулы и служит одним из основных центров третичных взаимодействий в 5S рРНК. Можно сказать, что петля А – это «сердце» всей молекулы. Последовательность нуклеотидов в пределах петли высоко консервативна. Как правило, мутации в этом районе приводят к серьезным изменениям пространственной структуры 5S рРНК и нарушению взаимодействий с белковыми факторами.

По энергетическим соображениям домены, по-видимому, всех 5S рРНК стремятся сформировать максимально протяженную стэкинг-систему. Это достигается несколькими способами, хотя принципиально отличающихся друг от друга типов геометрии всего три (рис. 1в). Для всех 5S рРНК, для которых сегодня установлены трехмерные структуры в составе большой рибосомной субчастицы, характерна геометрия семейства С (когда домены  $\beta$  и  $\gamma$  коаксиальны друг другу), хотя теоретически при такой организации петли А возможна и другая конформация – семейства А (коаксиальны домены  $\alpha$  и  $\gamma$ ).

Структуры остальных модулей молекулы отличаются высокой степенью сложности и поразительным разнообразием. Несмотря на свой сравнительно небольшой размер, 5S рРНК является настоящей «сокровищницей» самых разных неканонических элементов и мотивов, которые, хотя и встречаются по отдельности в других РНК, нигде более не присутствуют в столь тесном соседстве друг с другом. Внутренние и терминальные петли, выпетливания отдельных нуклеотидов, протяженные участки неканонического спаривания оснований и ряд других структурных особенностей формируют уникальный рельеф поверхности 5S рРНК, где многочисленные области расширения большой бороздки экспонируют множество химических групп, которые могут участвовать во взаимодействиях с другими макромолекулами.

Как всякая РНК в клетке, 5S рРНК всегда связана с тем или иным белковым фактором. От белкового компонента комплекса зависит не только стабильность 5S рРНК, но и направление ее перемещения внутри клетки.

Из всех известных РНК 5S характеризуется, пожалуй, наиболее сложными путями транспорта (рис. 2). Дело в том, что, в отличие от генов прочих рРНК, транскрипция генов 5S рРНК эукариот не связана с ядрышком, поэтому необходимо каким-то образом доставить этот компонент к месту сборки рибосомных субчастиц. «Путь доставки» оказался достаточно сложным [6–8]. Сначала новосинтезированная 5S рРНК связывается с транскрипционным фактором ТФША, который до этого принимал активное участие в ее «появлении на свет» (транскрипция генов 5S рРНК требует помимо РНК-полимеразы III

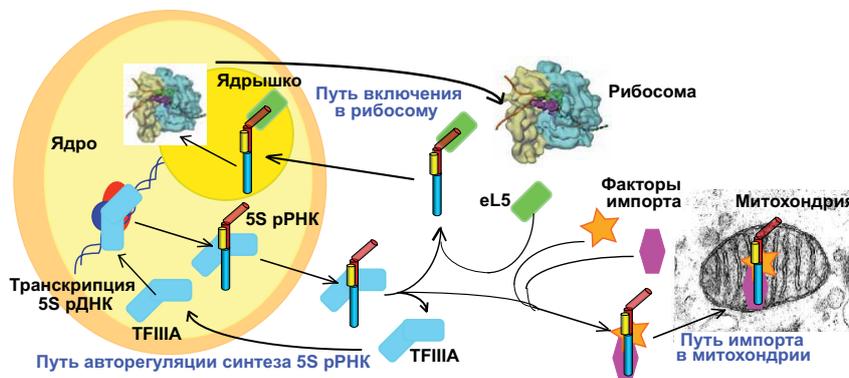


Рис. 2. Схема внутриклеточных перемещений эукариотической 5S рРНК.

присутствия трех транскрипционных факторов – TFIIIA, TFIIIB и TFIIIC). Полученный таким образом комплекс покидает ядро и выходит в цитозоль. Здесь 5S рРНК может некоторое время накапливаться в виде того же комплекса (например, в ооцитах *Xenopus laevis* – [9]) либо в составе более сложных мультикомпонентных РНП, включающих ряд белков, гомологичных TFIIIA, некоторые аминоксил-тРНК-синтетазы и тРНК [10]. Однако для проникновения в ядрышко 5S рРНК должна связаться с другим партнером – рибосомальным белком eL5. Белок eL5, равно как и его прокариотический гомолог L18, является основным 5S рРНК-связывающим белком в рибосоме. Белки eL5/L18-семейства присутствуют у всех организмов и абсолютно необходимы для включения 5S рРНК в состав большой субчастицы. Рибосомы прокариот, помимо L18, содержат, по крайней мере, еще один 5S рРНК-связывающий белок – L5 (несмотря на свое название, совершенно не родственник eL5 эукариот). Наконец, во многих бактериальных рибосомах 5S рРНК взаимодействует еще и с третьим белковым фактором – L25. Все вместе, 5S рРНК и ассоциированные с ней рибосомальные белки формируют основную часть центрального протуберанца большой субчастицы.

Функциональная роль 5S рРНК в рибосоме до сих пор не ясна. Известно, что в ее отсутствие трансляция становится невозможной [11]. Несмотря на это, многочисленные попытки обнаружить 5S рРНК в миторибосомах многоклеточных животных и грибов не увенчались успехом, что ставит под сомнение ее необходимость и «незаменимость» для биосинтеза белка. Сегодня все большее число специалистов сходятся во мнении, что 5S рРНК через многочисленные РНК-белковые и РНК-РНК взаимодействия выполняет роль «связующего

звена» между функциональными центрами рибосомы, координируя их активности, обеспечивая слаженность их работы [1, 12]. В пользу этой точки зрения свидетельствуют многочисленные факты как теоретического, так и экспериментального плана, хотя в целом вопрос о функциональной роли 5S рРНК все еще остается открытым.

### III. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ

#### СПИРАЛЬ I

Спираль I длиной 9–10 н.п., формирующая домен  $\alpha$ , обладает классической А-структурой [13], обычно весьма стабильной из-за высокого содержания G–C пар (высокое соотношение GC/AU характерно для всей молекулы 5S рРНК и никогда не бывает меньше 1). С одной стороны спираль I оканчивается 5'- и 3'-терминальными участками молекулы, которые часто не спарены на концах или имеют разную длину (при этом 5'-конец обычно заглублен). С другой стороны она обращена к петле А. Одна из характерных особенностей спирали I – повышенное (относительно других модулей молекулы) количество G–U пар, часть из которых являются *некомпенсированными* (то есть, в 5'-направлении от остатка гуанина находится пиримидиновый нуклеотид). Например, в подавляющем большинстве случаев пара G7:U112 является некомпенсированной, в то время как G8:U111 всегда компенсирована [14]. Присутствие некомпенсированных G:U пар приводит к локальным деформациям спирали из-за неэффективного стэкинга [15], что делает этот элемент вторичной структуры потенциально важным для РНК-белкового узнавания. Необходимо отметить, что в поддержании третичной структуры этой спирали также участвуют молекулы воды. Отчасти именно они стабилизируют G–U пары  $\alpha$ -домена.

Функциональное значение спирали I довольно велико. Ее специфическая вторичная и третичная структуры играют важную роль в стабилизации молекулы и возможности ее интеграции в рибосому. Мутации, нарушающие спаривание нуклеотидов или прерывающие стэкинг в пределах спирали, вызывают снижение скорости реассоциации рибосомных субчастиц, хотя и не сказываются на качестве трансляции [16].

Сравнительно недавно было показано, что специфическая терминальная структура 5S рРНК дрожжей имеет первостепенное значение для ее стабилизации, взаимодействия с рибосомальным белком eL5 и, соответственно, определяет возможность ее включения в форми-

рующуюся большую субчастицу рибосомы. 5S рРНК с правильно сформированными 5'- и 3'-концами эффективно взаимодействует с белком eL5 и проявляет высокую устойчивость к действию рибонуклеаз. Если же 5'-конец молекулы удлинен хотя бы на один нуклеотид, она практически полностью теряет способность взаимодействовать с eL5 и легко подвергается нуклеазному расщеплению [17].

Интактность спирали I важна и для взаимодействия 5S рРНК с фактором ТФША: делеции, приводящие к ее нарушению, практически полностью подавляют связывание [18]. Этот эффект, скорее всего, носит опосредованный характер, так как от стабильности спирали I зависит структура петли А, непосредственно участвующей во взаимодействии с ТФША.

#### СПИРАЛЬ II

Спираль II, являющаяся частью домена  $\beta$ , по целому ряду признаков отличается от спирали I. Во-первых, она во всех случаях образована исключительно каноническими уотсон-криковскими парами. Несмотря на то, что последовательность нуклеотидов этой области весьма вариабельна, ее вторичная структура всегда остается неизменной. Во-вторых, ее характерной особенностью является присутствие одного неспаренного нуклеотида, который, однако, не нарушает общей А-спиральной структуры. Тип нуклеотида, по сути, не имеет значения, хотя он и консервативен в пределах крупных таксонов [5]. Его основное назначение – внесение локального конформационного сдвига, результатом которого становится возникновение сайта связывания с белковыми факторами (белками eL5/L18-семейства, ТФША). Так, при связывании 5S рРНК *E. coli* с белком L18 эта область, а также 3'-сторона петли В, оказываются защищенными от расщепления РНКазами. Предполагают, что именно «выпетленный» А-66 в основном ответствен за связывание [19].

Исследование кристаллической структуры спирали II 5S рРНК *X. laevis* выявило существование двух форм этого структурного элемента, отличающихся друг от друга только положением неспаренного цитидина. В обоих случаях он вынесен далеко за пределы спирали, но в одной форме он направлен к петле А, а в другой – в противоположном направлении. По целому ряду параметров эта структура уникальна. Вытесненный из спирали цитидин имеет редко встречающуюся С3'-эндо транс-конформацию. В одной из форм в его непосредственной близости происходит локальное расширение большого желобка, что обеспечивает возможность связывания спирали II с белковыми факторами. Кроме того, было показано, что в кристалле этот

нуклеотид участвует в тройственных взаимодействиях с азотистыми основаниями соседних молекул. Авторы предполагают, что подобные взаимодействия могут иметь место при связывании с другими РНК *in vivo*, что, впрочем, пока остается лишь гипотезой [20].

#### ПЕТЛИ В И С

Особой сложностью организации отличаются одноцепочечные участки 5S рРНК. Это довольно компактные и хорошо структурированные элементы, специфическая конформация и стабильность которых обеспечиваются массой неканонических взаимодействий, особенно характерных для петель А, В и С, что коррелирует с функциональной значимостью этих районов молекулы. Так, петля В, располагаясь между спиралями II и III, не только не увеличивает внутреннюю подвижность домена β, но, напротив, обеспечивает непрерывность стэкинга оснований. Среди особенностей этой области – высоко консервативная пара С27:G58, характерная для большинства прокариотических молекул. Именно она ответственна за целостность общей спиральной структуры домена β [2]. Тем не менее, играя весьма важную структурную роль, петля В, видимо, не несет никакой специальной функциональной нагрузки. Выше уже отмечалось, что она входит в состав области 5S рРНК, защищаемой белками eL5/L18-семейства, хотя и не участвует в формировании сайта связывания с этими факторами.

Терминальная петля С играет коренную роль в процессе взаимодействия 5S рРНК с рибосомальными белками семейства eL5/L18, и особенно с бактериальным белком L5. Ее пространственная организация весьма сложна. Очевидно, ряд нуклеотидов вовлечены во вторичные и третичные взаимодействия, поддерживая структуру петли. Вместе с тем анализ подвижности остатков гуанина показывает, что конформация петли С носит полуоткрытый характер с широкими возможностями доступа к ряду оснований [21]. В сочетании с жесткой «подложкой», формирующейся за счет вторичных и третичных контактов, петля С является прекрасным сайтом специфического связывания с белковыми факторами.

Анализ изостерических матриц (это недавно разработанный метод сравнения и идентификации сходных в пространственном отношении РНК-мотивов) показал, что петля С 5S рРНК относится к так называемым С-подобным мотивам [22], которые достаточно часто встречаются в больших рибосомальных РНК (рис. 3а).

Интересная структурная особенность характерна для района спирали III-петли С 5S рРНК высших позвоночных. В этой области

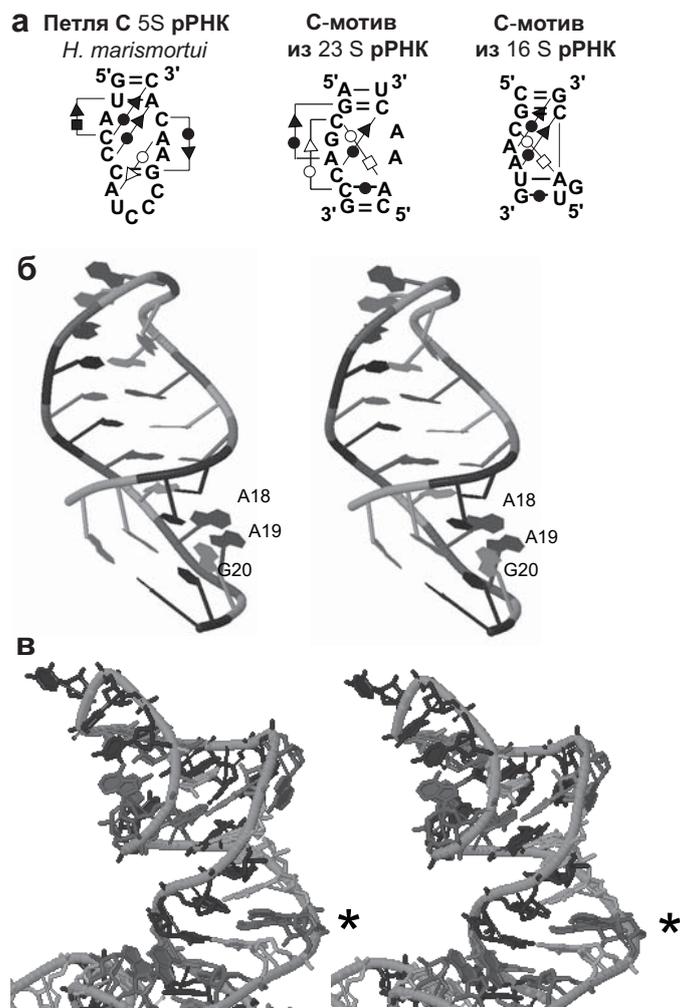


Рис. 3. Структурные особенности петли С и спирали III 5S рРНК.

(а) С-подобные мотивы, обнаруженные в рибосомальных РНК [22]. Обозначения типов спаривания: квадрат – Хугстиновское, круг – уотсон-криковское, треугольник – через остаток рибозы. Открытые символы соответствуют *цис*-конформации нуклеотида, закрытые – *транс*. Стандартные уотсон-криковские пары обозначены линиями без дополнительных символов (G=C и A-U).

(б) Стереоскопическое изображение спирали III 5S рРНК *X. laevis* в растворе [25] (*Jena Library*). Неспаренные остатки аденина обозначены как A18 и A19.

(в) Спираль III и петля С 5S рРНК *H. marismortui* в составе большой рибосомной субчастицы [26] (*Jena Library*). А-платформа отмечена звездочкой.

расположен палиндромный дуплекс 5'-GAUCUC-3'/3'-CUCUAG-5', который, по данным химического расщепления и анализа пространственной структуры 5S рРНК *X. laevis*, носит абсолютно симметричный характер с полностью спаренными основаниями (включая две необычные пары U : C) [23]. Функциональное значение этого элемента пока неясно.

### СПИРАЛЬ III

Спираль III является, пожалуй, одной из наиболее важных составляющих 5S рРНК всех организмов. Не только вторичная, но даже первичная структура этой области проявляют высокий уровень консервативности. Интересно, что недавно обнаруженная митохондриальная 5S рРНК *Acanthamoeba castellanii*, обладающая совершенно не характерной последовательностью нуклеотидов и лишь грубо напоминающая по вторичной структуре 5S рРНК, была идентифицирована только благодаря спирали III и петле C, обладающих разительным сходством с соответствующими элементами всех известных 5S рРНК [24]. Причина столь жесткой консервативности этой области молекулы кроется, по-видимому, в том, что именно этот элемент ответствен за взаимодействие 5S рРНК с важнейшими из ее партнеров – белками eL5/L18-семейства и, следовательно, за включение 5S рРНК в состав большой рибосомной субчастицы. Это взаимодействие особенно важно, поскольку из трех рибосомальных белков, способных связываться с 5S рРНК, лишь L18 (или его эукариотический гомолог eL5) присутствует абсолютно у всех видов.

Какие же структурные особенности делают спираль III столь удобным сайтом для связывания рибосомальных белков? Дело в том, что типичная для РНК-спиралей А-конформация оказывается искаженной из-за присутствия двух (реже трех) неспаренных нуклеотидов, формирующих короткую петлю прямо посреди спирали III (A50–A51 на рис. 1б). Столь примечательная и к тому же весьма консервативная особенность не могла не привлечь внимания исследователей на возможную важность этого элемента для поддержания специфической структуры спирали и взаимодействия с белковыми факторами.

Вопрос о нативной конформации этой «минипетли» и спирали III в целом в растворе удалось разрешить с помощью ЯМР-спектроскопического анализа [25]. На рис. 3б видно, что расположение неспаренных аденинов и фланкирующих их гуанинов асимметрично. Оба остатка аденина (A18 и A19 на рисунке) характеризуются преимущественной C2'-эндо конформацией рибозы. В большей части полученных структур присутствует характерный стэкинг двух

выпетленных оснований с расположенным за ними гуанином (G20). Вместе с тем, существует возможность существенно более свободного расположения выпетленных оснований, при этом стэкинг с фланкирующими парами нарушен: их плоскости почти перпендикулярны друг другу. Таким образом, данная область может обладать значительной конформационной подвижностью.

C2'-эндо форма остатков рибозы аденинов (вместо C3'-эндо, характерной для РНК-спиралей) приводит к возникновению локального перекручивания цепи, что вызывает перемещение всей стопки оснований в малую бороздку. Результатом этой перестройки становится раскрытие большой бороздки и экспонирование A18 и предшествующего ему гуанина (G17). Таким образом, весь элемент становится весьма благоприятным для связывания с белковым фактором.

Необходимо еще раз отметить, что все описанное относится к строению спирали III в растворе. Анализ структуры 50S субчастицы рибосомы *Haloarcula marismortui* [26] выявил принципиально иную организацию двухнуклеотидной «петли» в области спирали III (рис. 3в). Два аденина образуют так называемую А-платформу, в которой оба основания почти компланарны. Очевидно, при введении 5S рРНК в состав рибосомы происходит конформационная перестройка этой области. Как было продемонстрировано на 5S рРНК *E. coli*, *X. laevis* и ряда архей, связывание с белками eL5/L18 семейства ведет к реорганизации спирали III. Вполне возможно, что в случае *H. marismortui* образование А-платформы также индуцируется взаимодействием с этим белковым фактором.

Другой необычной особенностью спирали III ряда организмов является присутствие посттранскрипционных модификаций. Из всех элементов вторичной структуры 5S рРНК они были обнаружены лишь в спирали III и петле С. Особое значение модификации отдельных нуклеозидов приобретают у архей-термофилов *Sulfolobus solfataricus* и *Pyrodictium occultum*, живущих при температуре 105°C. Стабилизация спиралей 5S рРНК осуществляется двумя путями. Первый – появление в процессе адаптивной эволюции таких спиральных структур, в которых почти полностью отсутствуют остатки аденина и урацила. Второй путь адаптации, правда, не характерный для большинства организмов, – это особая модификация нуклеотидных остатков. В позиции 32 вместо цитидина находится 2'-О-метилцитидин, а на месте цитидина-35 – N<sup>4</sup>-ацетил-2'-О-метилцитидин. 2'-О-метилирование стабилизирует C3'-эндо конформацию рибозы, способствуя поддержанию А-формы, характерной для РНК-спиралей. Ацетильная группа, благодаря своим электроноакцепторным свойствам, повы-

шает кислотность протона при  $N^4$ , что увеличивает прочность водородной связи модифицированного основания с гуанином. В случае  $N^4$ -ацетил-2'-О-метилцитидина эффекты обеих модификаций аддитивны [27]. Метилирование С-32 было обнаружено и у другого архея *Sulfolobus acidocaldarius* [28].

Кроме архей, модификации (псевдоуридилрование) в спирали III характерны для 5S рРНК *Saccharomyces cerevisiae* (по остатку 50) и *Euglena gracilis* [29]. Псевдоуридин обеспечивает более эффективный стэкинг, чем уридин, что и способствует стабилизации спиральной структуры [30]. Во всех случаях, очевидно, модификации обеспечивают защиту спирали III и петли С от неблагоприятных структурных перестроек, что может быть связано с особенно важной функциональной ролью этой области молекулы 5S рРНК.

#### СПИРАЛИ IV И V И ПЕТЛЯ D

Строение домена  $\gamma$  5S рРНК несколько различается у бактерий и архей/эукариот, но в обоих случаях он представлен фактически единой спиралью, завершающейся петлей. Этот домен играет основную роль во взаимодействии с рибосомальным белком бактерий L25 [31], ТГША эукариот и с 23S рРНК. Формально он может быть представлен в виде двух спиральных участков (спирали IV и V), разделенных внутренней петлей E, и оканчивающихся терминальной петлей D. Весьма необычная структура петли E подробно рассмотрена в следующем разделе, здесь же мы остановимся на спиральях IV и V и петле D.

Спираль IV бактерий представляет собой классический дуплекс А-формы. Соответствующий район эукариотической 5S рРНК устроен более сложно. Во-первых, он всегда имеет неспаренный нуклеотид на своей 5'-стороне, тип которого, правда, слабо консервативен, часто он различается даже у видов, близких в систематическом плане. Еще одной интересной особенностью спирали IV высших эукариот является необычное противостояние U:U, геометрические параметры которого напоминают таковые *wobble*-пары G:U. Вообще, для спирали IV эукариот характерно повышенное содержание неканонических пар оснований. Появление такого количества необычных структурных элементов в одном модуле вызвало пристальный интерес к нему как с точки зрения структуры, так и с позиций возможной функциональной значимости.

Конформация спирали IV и петли D долгое время оставалась неясной. В большинстве случаев экспериментальные данные укладываются в традиционную схему, где спираль IV несет характерное «выпетливание» одного нуклеотида и завершается петлей D классического

GNRA-типа. Однако картина расщепления ряда растительных 5S рРНК в этой области говорит о возможности существования *расширенной петли D*, которая возникает из-за дестабилизации спиральной структуры, вызываемой неспаренным азотистым основанием [32]. Применение методов молекулярной динамики позволило прояснить этот вопрос на примере района спирали IV-петли D 5S рРНК люпина [33]. В этом случае петля D имеет классическую GNRA-структуру, хотя возможно ее существование в двух несколько различающихся конформациях. В поддержании одной из них участвует молекула воды, опосредующая связь между А и G, в другой же контакт между основаниями прямой.

Спираль IV обладает значительной конформационной подвижностью. Неспаренный нуклеотид может принимать разные, энергетически неэквивалентные конформации. Его перемещение в сторону большой бороздки приводит к размыканию соседних пар оснований и потому менее выгодно, чем в сторону малой бороздки. В последнем случае формируется весьма благоприятное тройственное взаимодействие с предыдущей парой нуклеотидов, однако кинетически это состояние трудно достижимо [34].

Функциональное значение спирали IV и петли D огромно, так как именно эта область молекулы ответственна за взаимодействие 5S рРНК с 23S рРНК, участвуя в интеграции РНК-компонента большой субчастицы. Относительно недавно у 5S рРНК было обнаружено совершенно новое свойство: оказалось, что она обладает активностью *ледзима*, то есть рибозима с  $Pb^{2+}$ -зависимой рибонуклеазной активностью. Областью, ответственной за энзиматические свойства, являются все те же спираль IV и петля D. Последовательность этой части молекулы сходна с последовательностью активного центра ледзима на основе тРНК<sup>Phe</sup>, но, в отличие от последнего, 5S-ледзим разрезает РНК *in trans*, предпочитая динуклеотиды CG. Предполагается, что подобная особенность молекулы 5S рРНК млекопитающих может являться важным аспектом токсичности свинца *in vivo*. Появление ионов  $Pb^{2+}$  даже в малых концентрациях способно индуцировать инактивацию многих клеточных РНК за счет, пожалуй, наиболее представленной в клетке макромолекулы с энзиматической активностью [35].

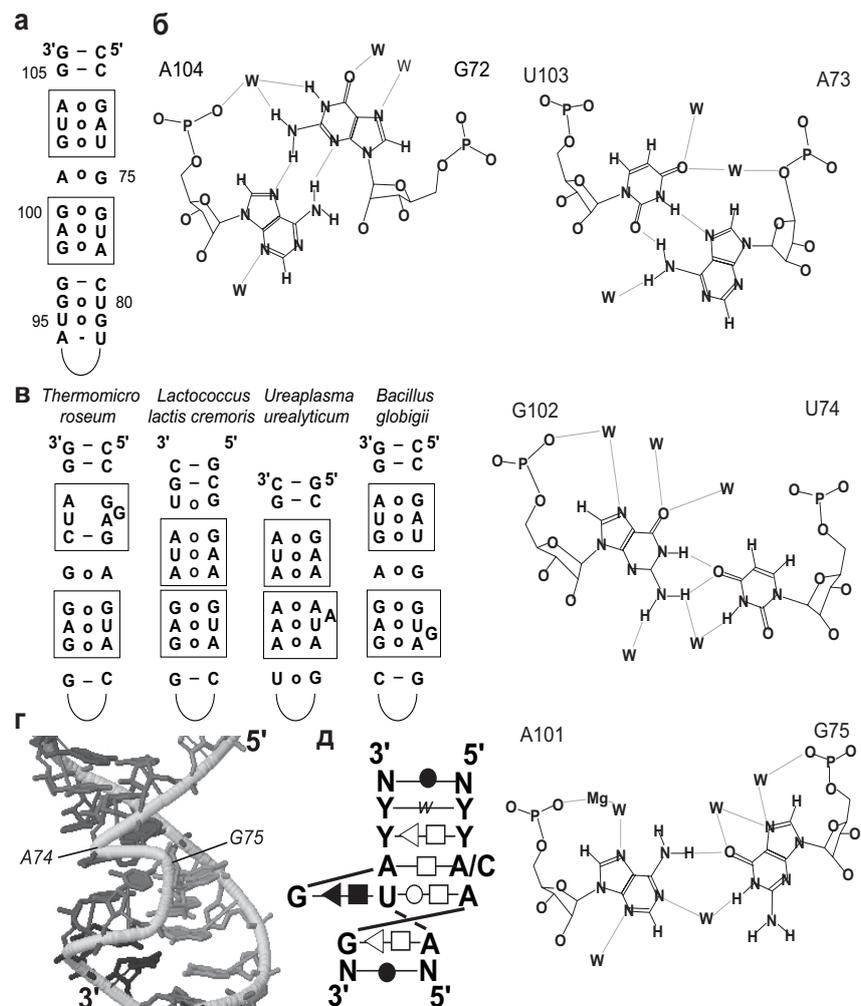
В отличие от описанного выше, о спирали V можно сказать довольно немного. В подавляющем большинстве случаев она не содержит никаких выпетливаний. Размер ее колеблется от 7–8 н.п. у эукариот/архей до двух пар у бактерий. Из характерных особенностей можно отметить лишь абсолютно консервативную пару G:U на границе спирали и петли A [14].

## ПЕТЛЯ E

Пожалуй, наиболее интересным и необычным структурным элементом 5S рРНК является внутренняя петля E, соединяющая спирали IV и V. Она имеет принципиально разное строение у бактерий (а также митохондрий и пластид) и у эукариот/архей. Таким образом, по терминологии Лекут-Вестофа [22], E-петля представляет собой пример *соответствующего* (то есть имеющего одинаковое расположение), но не *эквивалентного* (имеющего такую же пространственную организацию) мотива. Учитывая тот факт, что структуры, подобные петле E, встречаются и во многих других РНК, о чем будет подробнее сказано ниже, этот мотив можно отнести также к *рекуррентным* (то есть *широко распространенным, повторяющимся, частотным*). Различия в строении петель E, вероятно, можно отчасти объяснить неодинаковой функциональной нагрузкой этого элемента у представителей разных надцарств. Петля E бактерий образует сайт для связывания с рибосомальным белком L25, а у эукариот она взаимодействует с совершенно другим партнером – ТФША (и рядом гомологичных ему белков, участвующих в образовании РНК-запасующих 42S частиц в ооцитах *X. laevis*). РНК-связывающие домены этих белков имеют совершенно разную организацию, что накладывает определенные ограничения на строение их сайтов связывания. В связи с этим имеет смысл рассмотреть строение петель E обоих типов по отдельности.

*Петля E бактериального типа*

Консенсусная последовательность петли E и контекст, в котором она обнаруживается в 5S рРНК бактерий, показаны на рис. 4а. Структурно эта область представляет собой спираль, образованную протяженной серией неканонических пар, в которой отчетливо выделяются два палиндромных субмотива, играющих первостепенную роль во взаимодействии петли E с белком L25 и 23S рРНК. Упорядоченность и в целом закрытая конформация этого элемента были выявлены в опытах по расщеплению 5S рРНК рибонуклеазами, специфичными к одноцепочечным участкам. Петля E демонстрировала полную нечувствительность к подобной обработке [27]. Впоследствии этот вывод был подтвержден рентгеноструктурным анализом [36]. За поддержание столь необычной структуры ответственны многочисленные неканонические взаимодействия (рис. 4б). В наиболее полном виде они представлены в [37], где авторы сопоставили данные, полученные биохимическими методами и филогенетическим анализом, с кристаллической структурой петли E.

Рис. 4. Структурные особенности домена  $\gamma$  5S рРНК.

(а) Вторичная структура домена  $\gamma$  5S рРНК *E. coli*. Субмотивы петли Е выделены рамками. Петля D не показана.

(б) Пары нуклеотидов, образующие первый субмотив петли Е 5S рРНК *E. coli*, и разделяющая субмотивы пара A101:G75 [37]. W – молекулы воды.

(в) Варианты неканонической организации петли Е у некоторых бактерий [37].

(г) Трехмерная структура петли Е 5S рРНК *X. laevis* [58].

(д) Консенсусная вторичная структура мотива типа эукариотической петли Е [42].

Обозначения те же, что и на рис. 3а. W – связь между основаниями через молекулу воды.

Между спиралью V и петлей E нет четкой границы. Если считать, что спираль V начинается там, где появляются канонические пары нуклеотидов, то ее длина составит всего 2 пары. Обе они почти всегда представляют собой типичные уотсон-криковские G:C пары, выполняющие обычную для фланкирующих элементов функцию – поддержание терминальных участков петли или иной не A-спиральной структуры. Аналогичную роль играют пары, примыкающие к спирали IV.

Петля E может быть подразделена на три, в структурном плане практически независимых, участка. Два из них имеют весьма сходные последовательности нуклеотидов, образующие части несовершенного палиндрома. Они получили название *субмотивов*, в пределах которых соседние пары оснований образуют единую стэкинг-систему, а геометрия пар практически совпадает у обоих элементов. Характерной особенностью этих субмотивов является присутствие так называемых A-стопок, в которых стэкинг-взаимодействия связывают консервативные аденины первых двух пар, расположенные в разных цепях. Третья часть петли представлена единственной парой A:G, разделяющей субмотивы. Эта необычная пара поддерживается водородными связями между AN6 и GO6 и, через молекулу воды, между AN1 и GN1, что не редкость для подобного рода взаимодействий (рис. 4б).

В ряде бактериальных 5S рРНК происходят замены отдельных нуклеотидов, вовлеченных в формирование субмотивов. Замены носят строго определенный характер и во всех случаях удовлетворяют принципу *изостеричности*: конформация элемента, а значит, и тип спаривания в каждой его части унифицированы. Лишь в редких случаях петля E приобретает ряд нетипичных черт из-за инсерций или делеций, искажающих структуру субмотивов (рис. 4в).

Огромную роль в поддержании конформации петли E играют ионы  $Mg^{2+}$  и  $Na^+$  [38]. Как показывают молекулярно-динамические исследования, при введении в систему с петлей E *E. coli* ионов магния (естественных лигандов) ее конформация стабилизируется, принимает более закрытый характер, большая бороздка слегка суживается. При замене ионов магния на натрий происходит некоторое (до 4 Å) расширение большой бороздки, ее ширина постоянно меняется, возникает значительно более рыхлая, «дышащая» конформация.

Пожалуй, наиболее наглядной демонстрацией роли катионов в поддержании структуры петли E стало исследование ее поведения в безионной среде. Уже на первой наносекунде большая бороздка расширяется до 15 Å, а через 2 нс после начала эксперимента ширина достигает 20–22 Å (полностью денатурированное состояние) и более не меняется. Причем до самого конца спаривание оснований сохраняется, пары очень медленно приобретают все более открытую

конформацию, что говорит о значительной пластичности этого структурного элемента. При введении в систему ионов натрия и, в особенности, магния геометрия петли быстро восстанавливается.

Структуры, подобные петле E бактериального типа, соответствующие, по крайней мере, одному из субмотивов, можно обнаружить и в других РНК. Особенно богата ими 16S (18S) рРНК. Ряд аналогов обоих субмотивов, включая их точные копии, обнаружены у представителей всех систематических групп. Самый распространенный E-подобный мотив, обнаруженный в 59,8% известных последовательностей 16S рРНК в позициях 581–583 и 758–760, во всех случаях с одной стороны фланкирован уотсон-криковской парой, а с другой – парой G:U, то есть имеет контекст, весьма близкий таковому для петли E из бактериальной 5S рРНК. Структура, сходная с бактериальной петлей E, присутствует также в домене IV 7SL РНК из SRP-частицы [39–40].

#### ПЕТЛЯ E ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ТИПА

Еще более необычную организацию имеет петля E эукариотического типа. С бактериальным аналогом, помимо положения, ее объединяют закрытая конформация, грубо напоминающая A-спираль, и исключительно неканонический характер слагающих ее пар нуклеотидов. Однако она несколько менее протяженная (4 н.п.), всегда имеет один неспаренный гуанин (то есть является асимметричной петлей) и не содержит никаких повторяющихся субмотивов [41]. Фактически ее можно уподобить субмотиву 2 из петли E 5S рРНК *Ureaplasma urealyticum* и *Bacillus globigii* (рис. 4в), хотя, как будет видно дальше, сходство это довольно условно.

Необычность конформации петли E стала очевидна, когда выяснилось, что эта область не расщепляется агентами, специфическими и к одно-, и к двуцепочечным участкам РНК. Специфического расщепления удалось добиться лишь при использовании бис(фенантролин)(фенантренхинондиимин)родия (III), узнающего неклассические вторичные структуры и сайты третичных взаимодействий [23]. С учетом особенностей взаимодействия этого комплекса с РНК было выдвинуто предположение, что петля E обладает существенно более открытой конформацией, чем A-спираль, причем основную роль в ее поддержании играет стэкинг между соседними парами оснований.

Цепи, образующие петлю E, обладают совершенно разной геометрией (рис. 4г). Одна из них (более короткая) в целом соответствует A-форме РНК. Конформация же другой из-за присутствия «лишнего» G75 носит совершенно особенный характер. U73 и следующий за ним A74 связаны весьма необычными связями между остатками рибозы

и между рибозой и основанием, что приводит к «обращению» А74, и обе цепи в этом месте идут параллельно друг другу. Подобное геометрическое окружение вынуждает «выпетленный» G75 расположиться в большой бороздке, где он вовлечен в тройственное взаимодействие с соседними нуклеотидами.

Из-за своей наиболее характерной особенности мотив петли E получил также название «мотива выпетленного G» или «S-мотива». На самом деле под этим названием скрывается целый набор структурных элементов, которые объединяет высокая консервативность последовательности и общность конформации [42]. Взаимодействия, поддерживающие G-мотив, и его консенсусная последовательность представлены на рис. 4д. Как и для бактериальной петли E, для этого мотива характерно обилие разнообразных неканонических пар с конформациями нуклеотидов, типичными не только (и не столько) для уотсон-криковского спаривания, но также для Хугстиновского<sup>1</sup> и связывания через остаток рибозы или молекулу воды. Особенно интересен остаток уридина, образующий пары не только с аденозином противоположной цепи, но и с «неспаренным» гуанозином (соответствующим G75 петли E), непосредственно предшествующим ему. Такой тип связывания в сочетании с непрерывающимся стэкингом и приводит к появлению характерного S-поворота с двумя сменами направления хода цепи.

Несколько «расшатанная» стопка оснований, что опять же объясняется наличием трех ароматических систем в одной и той же плоскости, создает возможность стэкинга с соответствующими элементами других макромолекул. Необычная общая конформация, в которой большая бороздка значительно более открыта, чем в А-спирали, а неканонически спаренные основания предоставляют обилие разнообразных химических групп, может означать, что петля E – прекрасный сайт для взаимодействия с самыми разными партнерами. Среди таковых можно отметить фактор TFIIIA (см. ниже). В этом связывании значительную роль играет стэкинг с «тройной платформой» петли E. Другое важнейшее взаимодействие, также характерное для петли E эукариотического/архейного типа, – связывание 23S рРНК.

<sup>1</sup> Азотистое основание взаимодействует по Хугстиновскому типу, если в образовании водородных связей участвуют атомы при N6 (O6) и N7 пуринов и N4 (O4) и C5 пиримидинов. (Сравните с уотсон-криковским спариванием, где водородные связи образуют атомы при N1, N2 (в гуанине) и N6 (O6) пуринов и O2 (в цитозине), N3 и N4 (O4) пиримидинов).

Наверное, наиболее изученным примером S-мотива, помимо петли E эукариот, является сарцин-рициновая (S/R) петля из так называемого «ГТФазного центра» 23S рРНК, известный сайт атаки не только сарцина и рицина, от которых он получил свое название, но и ряда других ферментов (например, некоторых колицинов). Функциональное значение этого элемента трудно переоценить. С поверхностью, образованной GAGA-тетрапетлей и малой бороздкой S/R-петли связываются трансляционные факторы EF-G и EF-Tu, абсолютно необходимые для работы белок-синтезирующего аппарата у всех живых организмов. Таким образом, налицо еще один пример участия мотива выпетленного G в структуро-специфичном РНК-белковом взаимодействии [36].

Весьма оригинальную роль S-мотив играет в РНК многих вириодов растений. Элемент со структурой, аналогичной петле E эукариот, был обнаружен в РНК вириода веретенovidности клубней картофеля (PSTV) благодаря сходному характеру сшивания под действием ультрафиолетового облучения [43]. Сшивка соответствовала участку так называемой «центральной консервативной области», общей для многих растительных вириодов, что позволило предположить важную роль этого структурного элемента в их жизненном цикле. Авторы обратили внимание на то, что эта петля располагается в окрестности сайта, связанного с автокаталитическим процессингом димерных транскриптов PSTV, и выдвинули гипотезу об ее участии в формировании этого сайта. Гипотеза блестяще подтвердилась в работе Баумштарка и сотр. [44]. По результатам исследования была предложена модель процессинга прегеномных транскриптов, включающая крупные конформационные перестройки центральной консервативной области. Изначальный транскрипт, длиной более одного генома, содержит три шпильки, две из которых завершаются абсолютно консервативными GNRA-тетрапетлями. В такой конформации в РНК появляется первый сайт расщепления. После первого этапа процессинга 5'-фрагмент высвобождается, а новообразованный 5'-конец укладывается с образованием петли E эукариотического типа (в ней, правда, выпетленным оказывается цитозин). Этот элемент воспринимается как сигнал для второго расщепления, происходящего на этот раз в 3'-концевой части молекулы. Полученные в результате такого двуступенчатого процессинга концы точно противостоят друг другу и незамедлительно лигируются с образованием ковалентно замкнутой геномной РНК вириода.

Таким образом, благодаря своей необычной конформации, петля E может играть роль специфического элемента в самых разных

процессах: от связывания разнообразных макромолекул, обеспечивающих функционирование аппарата синтеза белка, до процессинга прегеномной РНК (необходимый этап жизненного цикла целого семейства виридов).

#### КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ И РЕОРГАНИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ 5S рРНК

Использование разнообразных физических, химических и энзиматических подходов при изучении структуры 5S рРНК в разных условиях привело к появлению представлений о существовании альтернативных структур этой молекулы. Для 5S рРНК целого ряда организмов была показана возможность конформационных переходов при изменении температуры, полярности среды, рН, а в ряде случаев даже сосуществования нескольких альтернативных нативных третичных структур в растворе. Предсказание подобных форм с помощью моделирования *in silico* в настоящее время представляется затруднительным ввиду участия в их образовании неканонических взаимодействий. Поэтому практически единственным источником наших знаний о поведении 5S рРНК в растворе являются физико-химические измерения и энзиматический или химический гидролиз, позволяющие сделать определенные выводы о строении 5S рРНК и распределении ее конформеров.

Для начала имеет смысл остановиться на ряде сообщений, которые привели к появлению концепции конформационной неоднородности 5S рРНК. Уайднер и Крозерс, изучая процесс ренатурации 5S рРНК *E. coli* в различных условиях, показали существование нескольких путей сворачивания этой молекулы. Так, если раствор этой РНК при высокой температуре быстро охладить, среди продуктов сворачивания наблюдаются примерно равные количества двух конформеров. В то же время, если сначала медленно охладить раствор до 50–60°C, а потом резко понизить температуру, то сворачивание приведет к единственному (нативному) продукту. Интересно, что стабильность структурного ядра интермедиатов сворачивания сильно зависит от содержания ионов  $Mg^{2+}$  в растворе [45].

Кайм и Мур, проанализировав ЯМР-спектры необмениваемых протонов 5S рРНК *E. coli*, показали существование двух нативных конформеров молекулы (форма А), легко отличимых от формы В [46]. Горинджер с сотрудниками, используя химическое и энзиматическое расщепление, а также модификацию доступных нуклеотидов, пришли к выводу, что два стабильных конформера 5S рРНК *E. coli* обладают рядом отличий во вторичной структуре [47]. При переходе из

формы А в форму В нарушается структура спирали II и, в меньшей степени, спиралей III и IV. В то же время полученные данные дают возможность предположить образование новых структурированных областей при переходе в форму В.

Као и Крозерс на основании анализа зависимости раннего плавления 5S рРНК *E. coli* от рН также пришли к выводу о существовании двух нативных конформаций, отличающихся степенью компактизации, константой диффузии и рядом других физических параметров. Переход между формами индуцируется сменой ионных условий и особенно рН (в частности, своеобразным переключателем может служить основной катализатор, предоставляемый, например, рибосомальным белком; это позволило авторам сделать предположения о возможном функциональном значении такого конформационного перехода) [48].

Существование трех конформаций также показано для 5S рРНК из печени крысы [49]. Однако в этом случае две дополнительные структуры являются результатом обработки мочевиной и ЭДТА соответственно. Нативная и обработанная мочевиной 5S рРНК комигрируют в неденатурирующем полиакриламидном геле, но показывают совершенно разный рисунок расщепления нуклеазами. Наибольшие отличия наблюдаются в области спирали III-петли С и в спирали V и петле D. Как и в предыдущем случае, вопрос о биологической значимости конформационных переходов 5S рРНК остается открытым.

Еще один пример конформационного перехода описан для 5S рРНК дрожжей. Подобно 5S рРНК *E. coli*, ее сворачивание является магниезависимым процессом. Связывание ионов  $Mg^{2+}$  происходит последовательно и кооперативно, причем каждая стадия сопровождается относительно медленной мономолекулярной конформационной перестройкой, что в итоге приводит к возрастанию упорядоченности РНК. Расчет активационных параметров каждого этапа сворачивания показывает, что данные изменения включают размыкание нескольких пар оснований и некоторые преобразования третичной структуры [50].

Необходимо отметить, что все описанные случаи конформационных перестроек наблюдаются в условиях, далеких от естественных. Действительно, трудно ожидать значительных перепадов ионной силы и рН в клетке. Это возможно лишь при наличии соответствующего микроокружения, которое могут обеспечить, к примеру, белки, взаимодействующие с 5S рРНК (в этом отношении рибосома – прекрасный пример подобной системы). Поиск альтернативных конформаций, проведенный с помощью программы paRNAss (<http://bibiserv.techfak>.

unibielefeld.de/parnass/) [51], показал, что 5S рРНК человека и дрожжей *S. cerevisiae* в постоянных ионных и температурных условиях не обладают способностью к крупномасштабным перестройкам. Вместе с тем для этих молекул характерна значительная лабильность отдельных модулей: петель А и Е, спиралей IV и V (в случае 5S рРНК дрожжей) и петли С (в 5S рРНК человека). Переходы между разными формами совершаются почти свободно, энергетические барьеры весьма низки. Таким образом, это не альтернативные конформации 5S рРНК, а лишь временные укладки, постоянно переходящие друг в друга без значимой энергии активации.

Итак, структурная организация молекулы 5S рРНК обладает значительными возможностями локальных перестроек в стабильных ионных и температурных условиях, однако глобальная реорганизация третичной структуры свободной 5S рРНК представляется сомнительной. Вместе с тем крупные перестройки пространственной структуры отдельных элементов и молекулы в целом могут быть вызваны связыванием с определенными белковыми факторами. Во многих случаях эти конформационные переходы имеют весьма важное функциональное значение. О взаимодействии 5S рРНК с разнообразными белками, а также с 23S рРНК и пойдет речь в следующем разделе.

#### IV. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ

##### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ ША

Ранее уже отмечалась та огромная роль, которую фактор ША играет в «судьбе» 5S рРНК. Помимо непосредственного участия в транскрипции ее генов, TFША функционирует как фактор, обеспечивающий экспорт 5S рРНК из ядра и ее стабилизацию в цитозоле до того момента, пока она не свяжется с рибосомальным белком eL5. Таким образом, он представляет большой интерес хотя бы потому, что связывается не только с геном, но и с его продуктом. TFША присутствует во всех эукариотических клетках и, очевидно, всегда играет сходную роль. Характерно, что он способен специфически связывать только 5S рРНК эукариотического типа, что может означать общность детерминант этого РНК-белкового взаимодействия у всех представителей надцарства [52] и отсутствие таковых в 5S рРНК бактериального типа.

Поиск и изучение сайтов связывания 5S рРНК с TFША проводился силами многочисленных исследовательских групп в течение двух

десятков лет. В самых ранних работах было установлено, что значительную роль во взаимодействии играет общая конформация РНК-молекулы. Так, нативная 5S рРНК достаточно быстро образует комплекс с ТФША, в то время как денатурированная связывается только при определенной концентрации ионов  $Mg^{2+}$ , которые в первую очередь ответственны за трехмерную организацию 5S рРНК. Было показано, что во взаимодействии участвуют спирали I, IV и V [18], кроме того, ТФША защищает от нуклеазного расщепления петли D и E и часть спиралей I и II. Таковы были первые выводы о положении сайтов связывания с ТФША [53].

В более поздней работе Ролинга и сотр. [54], выполненной на 5S рРНК *X. laevis*, эти сайты получили более детальное описание. Основную роль в связывании играет необычная конформация петли E. Наиболее важными нуклеотидами, участвующими в формировании сайта связывания, являются G75, U76 и A100, вовлеченные в тройственное взаимодействие. Точечные мутации в этом модуле приводят к существенному росту константы диссоциации комплекса 5S рРНК с ТФША. Примечательно, что при удалении U76 (метод «недостающего нуклеотида») падение сродства ТФША к 5S рРНК также носит наиболее выраженный характер [55].

Спираль V также участвует во взаимодействии, хотя ее роль менее выражена. Похоже, что единственное требование для этого структурного элемента – сохранение А-спиральной конформации, последовательность же не столь существенна. К примеру, трансверсия G40C, приводящая к появлению противостояния C : C, повышает константу диссоциации комплекса в 3 раза. В то же время транзигция G70A, при которой появляется неканоническая (однако уотсон-криковская) пара A : C<sup>+</sup>, никак не сказывается на связывании ТФША, так как параметры этой пары вполне укладываются в границы, допустимые структурой А-спирали.

Значительная роль общей трехмерной структуры 5S рРНК во взаимодействии с ТФША, о которой упоминалось выше, не могла не привлечь внимания исследователей к петле А – области, самым непосредственным образом отвечающей за взаимное расположение всех трех доменов молекулы. Замена U109C, приводящая к появлению уотсон-криковской пары на месте абсолютно консервативной G : U, снижает подвижность этого «шарнира», повышая при этом константу диссоциации в 2 раза. Большая серия мутаций, выполненная другой группой исследователей [56], также выявила существование корреляции между подвижностью петли А и сродством 5S рРНК к ТФША. В [57] мутационным анализом было продемонстрировано,

что из четырех нуклеотидов петли А три являются абсолютно необходимыми для распознавания фактором ТФША.

Совершенно иные результаты были получены для домена β. Точечные мутации в этой области молекулы весьма слабо сказываются на связывании с ТФША. Наиболее существенную роль играет спираль II, в которой первостепенное значение имеет сохранение уотсон-криковских взаимодействий и неспаренного цитозина, хотя в оценке вклада этого структурного элемента авторы ориентируются скорее на другие работы, речь о которых уже шла выше.

В противоположность ранним исследованиям, оказалось, что спираль IV и петля D практически совершенно не существенны для взаимодействия с ТФША. Большинство мутаций в этой области молекулы никак не сказываются на стабильности комплекса. Лишь замена С79G, приводящая к появлению неблагоприятного противосто-яния G:G в непосредственной близости от петли E, повышает  $K_D$  в 3 раза, что вполне объяснимо, если учесть роль петли E в связывании.

Сравнительно недавно удалось получить трехмерную структуру комплекса фрагмента ТФША, включающего цинковые пальцы 4–6 (всего в составе ТФША присутствует 9 цинковых пальцев ССНН-типа), с фрагментом 5S рРНК, содержащим все элементы, необходимые для взаимодействия (рис. 5а). Эта структура полностью подтвердила выводы, сделанные на основе использования биохимических методов. Три цинковых пальца взаимодействуют, соответственно, с петлей E, большой бороздкой спирали V и петлей A [58]. Подобное многоцентровое связывание обеспечивает одну из характерных функций ТФША – защиту 5S рРНК от деградации. Вместе с тем оно не препятствует распознаванию 5S рРНК белком eL5, сайт связывания которого расположен в спирали III и петле C, что является необходимым условием ее включения в состав рибосомы.

#### ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РИБОСОМАЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ EL5/L18-СЕМЕЙСТВА

Структура 5S рРНК, безусловно, интересна сама по себе. Однако говорить о рибосомальной РНК отвлеченно от ее естественного окружения – рибосомы – представляется неоправданным, хотя бы с точки зрения ее предполагаемых функций. В этом и последующих разделах речь пойдет о структуре 5S рРНК, находящейся в комплексе с макромолекулами рибосомы.

На рис. 5б показаны положение и пространственная структура 5S рРНК в большой субчастице рибосомы. Видно, что именно этот РНК-компонент играет основную роль в образовании центрального

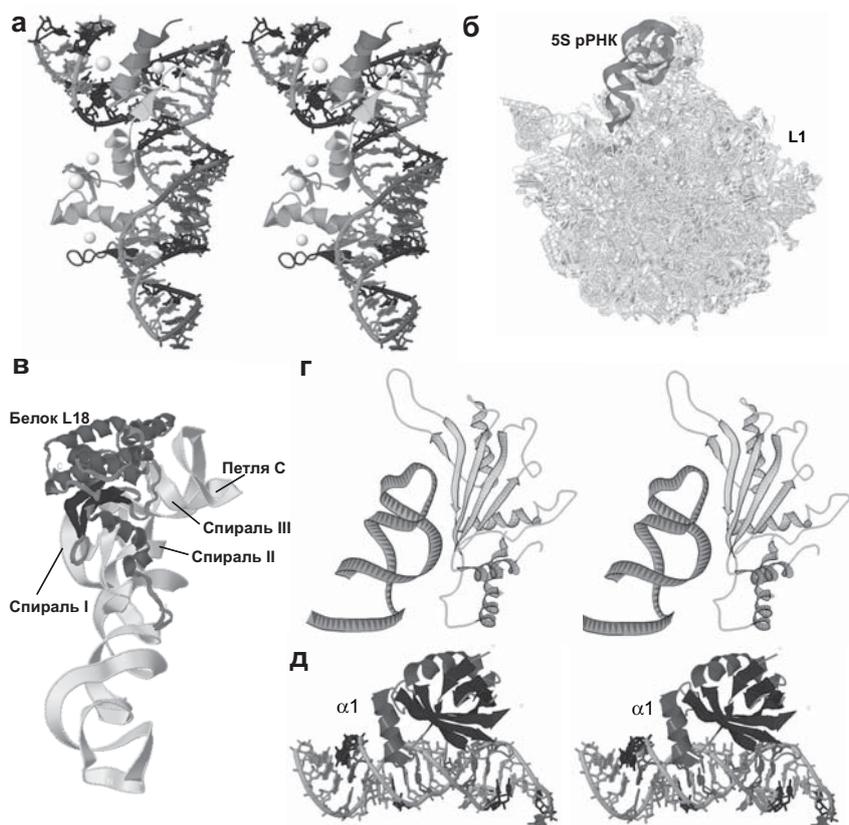


Рис. 5. Взаимодействия 5S рРНК с белковыми факторами.

(а) Стереоскопическое изображение комплекса фрагмента 5S рРНК с фрагментом, включающим три цинковых пальца ТФША *X. laevis* [58] (*Jena Library*). Домен  $\gamma$  расположен вертикально, домен  $\alpha$  – вверху слева.

(б) Расположение 5S рРНК в большой рибосомной субчастице *H. marismortui* [26] (*Jena Library*). Область, занимаемая белком L1, обозначена соответственно.

(в) Комплекс 5S рРНК с рибосомальным белком L18 из большой рибосомной субчастицы *H. marismortui* [26] (*Jena Library*).

(г) Стереоскопическое изображение комплекса фрагмента 5S рРНК *E. coli*, включающего спираль III и петлю C, с белком L5 *Thermus thermophilus* [76] (*RCSB*).

(д) Стереоскопическое изображение комплекса домена  $\gamma$  5S рРНК *E. coli* с белком L25 [80] (*Jena Library*). Отмечена образующаяся в результате взаимодействия дополнительная спираль  $\alpha 1$ .

протуберанца. Рибосомальная РНК в структурном отношении представляет собой своего рода «скелет» рибосомы, на котором располагаются рибосомальные белки. 23S рРНК формирует почти все структуры, характерные для большой субчастицы. Исключение составляют лишь боковой протуберанец, образованный белком L1, и центральный выступ, структурной основой которого служит 5S рРНК. Подобно большому рРНК, она также «декорирована» белками, число и тип которых различаются у представителей разных систематических групп. Эти белки, а также 23S рРНК обеспечивают интеграцию всего центрального выступа в большую частицу рибосомы.

В данном разделе речь пойдет о рибосомальных белках, которые всегда обнаруживаются в комплексе с 5S рРНК, независимо от систематического положения организма. Другими словами, это в высшей степени универсальные и крайне консервативные лиганды 5S рРНК – белки eL5/L18-семейства.

Хотя белки этого семейства у бактерий (L18) и эукариот (eL5) существенно различаются и по аминокислотной последовательности, и по размеру, их отчетливая гомология позволяет предполагать сходство третичных структур и способа взаимодействия с 5S рРНК. 5S рРНК архей связана с рибосомальным белком L18 (рис. 5в), более напоминающим эукариотический eL5, нежели бактериальный L18, что согласуется с общностью строения 5S рРНК у представителей именно этих двух таксонов [59].

Большая часть работ посвящена взаимодействию 5S рРНК с эукариотическими и архейными белками, поэтому связывание бактериального L18 будет рассмотрено лишь вкратце. В предыдущих разделах уже упоминались основные структурные модули 5S рРНК, так или иначе участвующие в этом взаимодействии. Большинство из них сосредоточено в домене  $\beta$  (спирали II и III, петля C – см. рис. 5в) [19, 60, 61], хотя известно, что белок защищает от расщепления практически всю молекулу РНК [31]. Такого рода «обволакивание» 5S рРНК не может не сказываться на ее общей конформации. И действительно, изучение спектров кругового дихроизма и температурной зависимости поглощения в ультрафиолетовой области свидетельствует о наличии значительных перестроек во вторичной и, возможно, третичной структуре 5S рРНК *E. coli* при образовании комплекса именно с рибосомальным белком L18. Другие рибосомальные белки, связывающие бактериальную 5S рРНК, – L5 и L25 – не только не стабилизируют высшие уровни организации 5S рРНК, но в последнем случае даже снижают степень упорядоченности вторичной структуры. Таким образом, можно считать, что белок L18

является основным фактором компактизации и стабилизации 5S рРНК в рибосоме прокариот [62].

Комплекс 5S рРНК с рибосомальными белками, выделенный из галофильного архея *Halobacterium cutirubrum*, сильно отличается по своим характеристикам от аналогичного комплекса, обнаруженного в *E. coli*. Исследование спектров кругового дихроизма свидетельствует об усилении стэкинга и некотором ослаблении взаимодействий между спаренными основаниями в связанной РНК. Третичная структура 5S рРНК в комплексе носит несколько более открытый характер. Авторы провели подробный анализ вторичной структуры связанной 5S рРНК с помощью различных рибонуклеаз [63]. Полученные результаты позволили им предположить, что при связывании с L18 РНК претерпевает значительные конформационные изменения, в результате которых формируется альтернативная укладка с полностью перестроенным доменом  $\gamma$ . Похожая вторичная структура была впервые предложена Нишикавой и Такемурой [64] для свободной 5S рРНК, но, по-видимому, она реализуется лишь в этом случае.

К подобным выводам, как нам кажется, необходимо подходить с большой осторожностью, в частности, имея в виду, что кристаллическая структура 5S рРНК в большой субчастице рибосомы другого архея *H. marismortui* вполне отвечает классической Y-образной организации (рис. 1а). Вместе с тем установлено, что, по крайней мере, основные сайты взаимодействия с белком L18 претерпевают значительные перестройки (рис. 3б, в). Характер взаимодействия между нуклеотидами меняется в области петли С, неспаренный динуклеотид AA спирали III экспонируется наружу с образованием А-платформы, другой внеспиральный аденин, наряду с соседними нуклеотидами спирали II, вступает в третичные взаимодействия с элементами, формирующими петлю А [26].

Весьма подробно охарактеризовано взаимодействие 5S рРНК с эукариотическим рибосомальным белком eL5. В 1971 г. появилось сообщение о выделении комплекса 5S рРНК с белком из рибосом млекопитающих (печени крысы и ретикулоцитов кролика). Авторы показали, что 5S рРНК высвобождается из рибосомы при удалении из среды ионов  $Mg^{2+}$  или при повышении концентрации одновалентных катионов. Седиментационные и электрофоретические исследования показали, что она выделяется не в свободном виде, а в стабильном комплексе с одним рибосомальным белком с массой  $35 \pm 2$  кДа [65].

При диссоциации 60S субчастиц из печени крысы в растворе сульфата цезия образовывались три комплекса, один из которых, с плотностью 1,40 г/мл, соответствовал рибонуклеопротеиду. РНК,

входящая в его состав, оказалась 5S, а белок – eL5, причем расчет показал, что их соотношение эквимольно [66]. Эти две работы можно считать началом исследования 5S рРНК-белковых взаимодействий в рибосомах эукариот.

Энзиматическим анализом было продемонстрировано, что, как и в случае с ТФПА, белок eL5 обеспечивает защиту практически всей молекулы 5S рРНК от нуклеазного расщепления. [67]. Важное значение этого эффекта становится очевидным, если вспомнить о той роли, которую eL5 играет в «жизни» 5S рРНК в клетке.

Достаточно подробно охарактеризован комплекс 5S рРНК с белком eL5 *X. laevis* [68]. Оказалось, что он стабилен в достаточно широких пределах изменения ионной силы, что говорит о значительной роли неэлектростатических взаимодействий. Константа диссоциации комплекса в оптимизированных условиях – 2 нМ. Опираясь на данные о сайтах защиты 5S рРНК белком, авторы исследовали взаимодействие мутантных версий 5S рРНК с точечными заменами в области между 42-м и 109-м нуклеотидами с целью выявления сайта связывания с белком eL5. Важнейшими элементами структуры, ответственными за это взаимодействие, оказались спираль III и петля C. Мутации, затрагивающие область соединения между этими элементами, приводили к увеличению константы диссоциации комплекса более чем на порядок. Катастрофический для связывания эффект имели замены консервативных неспаренных аденинов спирали III. Прочие же мутации, затрагивающие петлю B, спираль II (правда, это не касается выпетленного цитозина), спирали IV и V, петлю E, не вызывали заметного эффекта.

Интересно, что комплекс 5S рРНК дрожжей с рибосомальным белком eL5 демонстрирует ряд свойств, сближающих его с комплексом из *H. cutirubrum*, описанным выше. Конформации свободной и связанной 5S рРНК, определенно, имеют различный характер. Эксперименты с тритиевым обменом, включением бромистого этидия и термальной денатурацией 5S рРНК в обоих состояниях показали, что при диссоциации комплекса общая конформация РНК меняется. В комплексе представленность двуцепочечных участков снижена, а характер кинетики денатурации позволяет предположить, что вторичная структура связанной РНК реорганизована. Авторы считают, что eL5 стабилизирует определенную функциональную конформацию 5S рРНК, лабильную в растворе [69]. Эти данные перекликаются с упомянутыми выше сведениями о перестройке одного из основных сайтов взаимодействия с белками eL5/L18-семейства – динуклеотидного выпетливания в спирали III (см. выше),

обнаруженной в 5S рРНК *H. marismortui*. Конечно, эти изменения носят локальный характер. Однако, учитывая большую поверхность связывания eL5, можно предполагать наличие и других конформационных подвижек, суммарное действие которых аналогично наблюдаемому авторами последней работы.

Объяснение подобному поведению 5S рРНК при связывании с белком eL5 удалось найти лишь в последние годы. Во-первых, особенностью данного комплекса является котрансляционный характер его образования [70]. Долгое время не удавалось получить такой комплекс из отдельных компонентов *in vitro*. Оказалось, что 5S рРНК связывается исключительно с растущей цепью eL5 в процессе трансляции мРНК последнего. Первые 50 аминокислот белка абсолютно необходимы для взаимодействия и, по-видимому, образуют РНК-связывающий домен (хотя вопрос о том, что же в действительности в eL5 связывает 5S рРНК, остается открытым). Очевидно, такой характер взаимодействия компонентов комплекса позволяет четко регулировать соотношение 5S рРНК и eL5 в будущей рибосомной частице; это также объясняет, почему путь перемещения 5S рРНК от своего гена к ядрышку носит столь «извилистый» характер. Во-вторых, взаимодействие между 5S рРНК и белком eL5 весьма необычно потому, что осуществляется по так называемому механизму взаимно индуцированного соответствия (*mutual induced fit binding*) [71, 72]. Рибосомальный белок eL5 в свободном состоянии представляет собой сравнительно мало структурированную макромолекулу. Однако при связывании с 5S рРНК его конформация перестраивается и стабилизируется. Влияние партнеров оказывается обоюдным, и 5S рРНК также претерпевает реорганизацию. Таким образом, как белок, так и РНК в данном случае ведут себя как *частично не структурированные шапероны*, обеспечивая правильное сворачивание друг друга с образованием функционально активной конформации [73].

К сожалению, до сих пор не получено ни одного кристалла комплекса 5S рРНК с белком eL5. Это затрудняет дальнейшее исследование их взаимодействия. Конечно, сейчас известны структуры целых рибосомных субчастиц (правда, лишь прокариотических), на которых можно видеть не только относительное расположение компонентов, но и взаимодействующие остатки аминокислот и нуклеотидов. Однако нельзя забывать, что в рибосоме этот комплекс подвержен влиянию окружающих макромолекул и его микроокружение принципиально иное. В частности, методом индуцируемого йодом расщепления фосфотиоатных производных 5S рРНК было показано,

что при интеграции в рибосому 5S рРНК-белкового комплекса РНК претерпевает дальнейшие перестройки, при этом изменяется характер распределения защищаемых областей [74].

#### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РИБОСОМАЛЬНЫМ БЕЛКОМ L5 ПРОКАРИОТ

Другим рибосомальным белком, взаимодействующим с 5S рРНК, характерным, правда, лишь для бактерий и архей (единственное известное исключение среди эукариот – дрожжи *S. cerevisiae*) и играющим существенно менее важную роль, чем L18, является L5. Ни по структуре, ни по свойствам и характеру связывания он не похож на эукариотический eL5, но, увы, подобная номенклатурная путаница постоянно создает сложности и необходимость четко оговаривать, о каком именно белковом факторе идет речь.

Весьма низкая константа связывания L5 с 5S рРНК ( $2,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) долгое время не позволяла определить сайты взаимодействия с этим белком. Дело в том, что L5 может с высоким сродством связывать 5S рРНК только в том случае, если она уже находится в комплексе с L18 (при этом константа связывания возрастает примерно на порядок) [75]. Таким образом, можно предположить, что сайт связывания с L5 не преформирован, а появляется только после взаимодействия с L18, либо для связывания L5 с 5S рРНК необходимо белок-белковое взаимодействие с L18.

В работе Г.М.Гонгадзе и сотр. [61] методом защиты от рибонуклеаз был определен устойчивый к расщеплению фрагмент 5S рРНК *E. coli*, с которым специфически связывается белок L5 *Thermus thermophilus* (связывание этого белка с 5S рРНК обоих организмов, весьма близкими друг к другу по первичной структуре, происходит с примерно равной эффективностью). Интересно, что картины ограниченного расщепления РНКазой А для изолированной 5S рРНК и в присутствии L5 не различаются. Однако в том случае, если исследовался тройственный комплекс 5S рРНК с L18 и L5, защищенная область отличалась от той, что возникла при обработке РНКазой комплекса 5S рРНК только с L18. Она увеличивалась на 8 нуклеотидов, захватывая петлю С, которая, по заключению авторов, и являлась сайтом связывания L5. Таким образом, L18 принимает непосредственное участие в связывании L5 с 5S рРНК. Взаимодействие между этими двумя белками было также показано, в частности, при анализе кристаллической структуры большой субчастицы рибосомы *H. marismortui* [26].

В следующей работе [76] авторы провели подробный анализ кристаллов комплекса L5 с фрагментом 5S рРНК, включающим

петлю С и спираль III (рис. 5г). По сравнению со свободной 5S рРНК структура петли С связанного фрагмента претерпевает значительные изменения: возникает масса новых связей, причем не только в самой петле, но и между нуклеотидами петли и спирали. Особую роль в построении специфической конформации этой области играют два локуса тройственных взаимодействий, один из которых завершает спираль III, а другой формируется нуклеотидами петли прямо над ним. Они лежат в основании своего рода «пирамиды», вершину которой образуют остальные остатки петли С. Именно такая геометрия петли С необходима для связывания с L5, и, по-видимому, такое ее строение характерно для всех бактерий и архей: эта область проявляет крайне высокую консервативность первичной структуры.

Белковый сайт связывания также составлен весьма консервативными остатками тяжей  $\beta 2$  и  $\beta 3$  и фланкирующих петель, причем он, как и пирамида петли С, поддерживается сложной сетью внутримолекулярных взаимодействий. Неполярные группировки РНК и белка образуют общее гидрофобное ядро взаимодействия, хотя, безусловно, водородные связи также играют важную роль в связывании партнеров. В отличие от ситуации с L18, РНК-связывающий домен L5 четко охарактеризован (см. в частности, [77]). Вогнутая поверхность взаимодействия, подвижные петли, участвующие в более прочном связывании, распределение положительно заряженных остатков и, наконец, характерная последовательность говорят о том, что этот домен относится к RRM-семейству (*RNA Recognition Motif*), хотя и не является типичным его представителем.

В заключение необходимо отметить, что, помимо 5S рРНК, L5 взаимодействует также с 23S рРНК, что было показано при анализе кристаллической структуры большой субчастицы *H. marismortui* [26]. Таким образом, этот белок участвует в интеграции 5S рРНК в рибосому, выступая своего рода связующим звеном между двумя рРНК, формирующими скелет большой субчастицы.

#### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ РИБОСОМАЛЬНЫМ БЕЛКОМ L25**

Последний белок, о котором пойдет речь в настоящем обзоре, – L25 – характерен только для бактерий и, таким образом, является третьим 5S рРНК-связывающим фактором из бактериальных рибосом. Его гомологи описаны под разными названиями для довольно большого числа видов. Среди них TL5 из *Th. thermophilus* (здесь опять налицо некоторое неудобство номенклатуры, носящей индивидуальный характер для рибосом каждого конкретного вида; в последнее время

всем гомологичным рибосомальным белкам бактерий даются названия в соответствии с номенклатурой *E. coli*, то есть в данном случае это L25 *Th. thermophilus*), общий стрессовый белок СТС *Bacillus subtilis* и *Aquifex aeolicus* [78]. Общность сайтов связывания, гомология последовательности и консервативность РНК-связывающих доменов (6-тяжевой  $\beta$ -бочонок и две/три  $\alpha$ -спирали) свидетельствуют о том, что эти белки образуют отдельное семейство, причем их третичная структура напоминает таковую антикодон-связывающего домена глутаминил-тРНК-синтетаз [79].

Как и в случае с рибосомальным белком L5 прокариот, сайт связывания L25 носит узколокальный характер и ограничивается пределами петли E и проксимальной части спирали IV. Подобно L5, белок L25 защищает от нуклеазного расщепления довольно ограниченную область молекулы (нуклеотиды 72–86 и 94–109), что связано с довольно компактными размерами этого фактора [60]. Получение кристаллов комплекса L25 с фрагментом 5S рРНК, включающим его сайт связывания, позволило детально охарактеризовать это взаимодействие (рис. 5д) [80]. Конформация петли E в комплексе носит точно такой же характер, как и в свободной 5S рРНК (см. выше): наблюдается полный набор неканонических взаимодействий, обязательное спаривание всех оснований и двуспиральная структура. Интересной особенностью петли E в комплексе с L25 является относительная независимость конформации и эффективности связывания от присутствия ионов  $Mg^{2+}$ . Выше упоминалось о той основополагающей роли, которую магний играет в поддержании характерной геометрии петли. Очевидно, белок способен восполнить потерю этих катионов и самостоятельно структурировать связываемую область.

Итак, связывание не имеет никаких заметных последствий в отношении молекулы РНК. Фактически то же самое можно сказать и про второго партнера. Структуры свободного и связанного L25 весьма сходны:  $\beta$ -бочонок и две  $\alpha$ -спирали ( $\alpha_2$  и  $\alpha_3$ ) почти точно совпадают при сопоставлении структур изолированного и вовлеченного во взаимодействие с 5S рРНК белка. Однако отмечена одна весьма важная перестройка, напрямую связанная с образованием РНК-белкового комплекса: большая неструктурированная петля между тяжами  $\beta_1$  и  $\beta_2$ , типичная для свободного белка, приобретает конформацию третьей  $\alpha$ -спирали ( $\alpha_1$ ), образуя часть белкового сайта связывания. Взаимодействие имеет двуцентровой характер. Первый сайт представляет собой одну из сторон  $\beta$ -бочонка. Он контактирует с расширенной малой бороздкой петли E в области пар A73:U103 и U77:A99 и, по-видимому, является главным «РНК-опознающим»

модулем белка, реагирующим на особый рисунок донорных и акцепторных групп в этой области петли. Второй сайт, как уже отмечалось выше, образован N-концевой частью спирали  $\alpha 1$ , которая взаимодействует с расширенной большой бороздкой петли и проксимальной частью спирали IV. Поверхности связывания включают как области с высоким электростатическим потенциалом, так и крупные незаряженные участки, что говорит об использовании разнообразных типов связывания при образовании РНП. Интересно, что, несмотря на квазисимметричное строение петли E, связывание не проявляет никаких признаков симметрии. Абсолютное большинство аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии, связаны с 3'-стороной петли. Лишь 8 нуклеотидов из 20, расположенных в сайте связывания, образуют контакты с аминокислотными остатками, причем только 6 из них являются электростатическими, то есть подразумевают определенную специфичность связывания. Значительное число связей с белковыми группами образуют остатки рибозы. Некоторые из взаимодействий, по-видимому, осуществляются опосредованно через молекулы воды.

Выше были рассмотрены взаимодействия 5S рРНК с теми белковыми факторами, которые образуют ее ближайшее окружение в большой рибосомной субчастице. Как это можно было видеть (см. рис. 5), три основные группы рибосомальных белков – eL5/L18, прокариотический L5 и L25 – демонстрируют разные типы связывания с одной и той же молекулой. Белки eL5/L18-семейства, как правило, обеспечивают защиту почти всей 5S рРНК, взаимодействие с ними носит многоцентрированный характер, является крайне специфичным и высокоаффинным. При связывании происходят значительные перестройки структуры обоих партнеров. Это основной белковый фактор, присутствующий абсолютно во всех рибосомах. Прокариотический белок L5 – почти полная противоположность L18/eL5. Его сайт связывания и защищаемая область крайне ограничены. Средство к РНК повышается только в присутствии связанного L18. Однако, как и в предыдущем случае, оба партнера претерпевают некоторые изменения конформации. Если рибосомальный белок L18 играет ведущую роль в интеграции 5S рРНК в большую субчастицу через белок-белковые взаимодействия, то L5 обеспечивает объединение рРНК-компонентов через два РНК-белковых контакта. Наконец, исключительно бактериальный L25 также взаимодействует с довольно узкой областью РНК, хотя и обеспечивает защиту почти всего домена  $\gamma$ . В отличие от других партнеров, он не вызывает никаких заметных изменений в структуре связываемой РНК и сам

подвергается лишь небольшим, хотя и функционально весьма значимым, перестройкам.

Во всех случаях в образовании РНК-сайтов участвуют элементы с неканонической вторичной структурой, предоставляющие существенно большее количество и разнообразие групп для взаимодействия с белком. Учитывая изобилие подобных элементов в 5S рРНК, едва ли стоит удивляться столь большому количеству белковых факторов, связывающихся с ней, и такому разнообразию стратегий РНК-белкового взаимодействия, которые они используют.

#### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С 23S РРНК

Выше уже шла речь о разных способах интеграции РНК-компонента, образующего «скелет» большой субчастицы рибосомы. Первый, реализуемый прежде всего при посредстве белков eL5/L18-семейства, состоит в образовании белок-белковых взаимодействий между факторами, связывающимися с каждой из двух рРНК. Второй способ – использование белкового «мостика», который одновременно связывает обе молекулы РНК, – реализует прокариотический белок L5. Наконец, третий и самый простой способ – прямое взаимодействие между рРНК – будет описан в настоящем разделе.

Изучение РНК-РНК взаимодействий – задача, более сложная, чем исследование связывания между компонентами РНП. Это обусловлено не только крайней нестабильностью РНК, зависимостью константы диссоциации от массы дополнительных факторов, но и с весьма ограниченным набором методов, применяемых в этом случае. Фактически их два: образование разного рода сшивок между основаниями и анализ пространственных структур природных комплексов (например, рибосомных субчастиц). Обе эти стратегии были использованы при исследовании взаимодействия 5S рРНК с 23S рРНК.

В работах российских исследователей О.Донцовой и сотр. [81], С.Докудовской и сотр. [82] взаимодействие между двумя рибосомальными РНК исследовалось с помощью образования межмолекулярных сшивок. Для этой цели были получены транскрипты 5S рРНК *E. coli* со случайным образом введенными заменами уридина на тимоурин. При фотоиндукции модифицированная 5S рРНК образовывала сшивки с 23S рРНК как в 50S, так и в 70S комплексах. Положение сшивки, таким образом, маркировало сайты взаимодействия между двумя рРНК. Благодаря этой методике были выявлены два участка 23S рРНК, специфически взаимодействующие с 5S рРНК. Первый (С2475) находится на вершине шпильки спирали-89 в домене V вблизи пептидилтрансферазного кольца; второй (А960) – на вершине

спирали-39 домена II. В обоих случаях во взаимодействии участвует U89 петли D 5S рРНК.

Очевидно, эти сшивки носят взаимоисключающий характер, и, какой из доменов 23S рРНК окажется в итоге ковалентно связан с U89, зависит от многих факторов. В том случае, когда для реконструкции 50S субчастиц использовали 23S рРНК, выделенную на сахарозном градиенте с ЭДТА, доминировала сшивка с A90. Выделенная же в присутствии магния, та же рРНК сшивается по позиции C2475. Очевидно, что оба участка 23S рРНК находятся в непосредственной близости от петли D 5S рРНК, так как тиюридин является так называемым реагентом «нулевой длины», то есть отклонение от сайта связывания на 1–2 Å полностью предотвращает возможность сшивания. О возможном функциональном значении этих контактов подробно рассказано в следующем разделе.

К сожалению, описанный выше метод, несмотря на значительные преимущества, не позволяет идентифицировать все возможные типы РНК–РНК взаимодействия, хотя бы потому, что не всегда в них вовлечены остатки уридина. В связи с этим, большие надежды возлагались на анализ пространственной структуры большой субчастицы рибосомы *H. marismortui* [26]. И действительно, в [83] было показано, что 5S и 23S рРНК имеют по крайней мере еще один специфичный контакт друг с другом (рис. 6а). Это типичное А-минорное взаимодействие типа 0. Как во всяком связывании подобного рода, адениновый нуклеотид внедряется в малую бороздку спирали партнера. Особенностью типа 0 является участие в образовании водородной связи 2'-ОН группы рибозы, при этом собственно азотистое основание не входит в малую бороздку. По этой причине тип основания, в общем, не имеет большого значения (хотя контакт оптимален в случае аденина), рибоза обеспечивает связывание с любой комбинацией групп партнера. Взаимодействие между 5S и 23S рРНК примечательно тем, что оно носит симметричный характер. Первая из названных рРНК предоставляет для этого лучшее из своего «арсенала» – петлю E, в которой пара G:A вместе со следующей за ней обратной Хугстиновской U:A образуют межцепочечный стэкинг из трех аденинов. 23S рРНК, чрезвычайно богатая подобными элементами, использует для взаимодействия аналогичную структуру из спирали-38 домена II. Итогом становится спираль-спиральное связывание, в которое вовлечены шесть остатков аденина.

Таким образом, весь набор неклассических элементов, существующий в 5S рРНК, несет функциональную нагрузку, обеспечивая взаимодействия с многочисленными факторами как белковой, так и нуклеиновой природы. Это тем более поразительно, поскольку все

они являются частями молекулы РНК крайне малых размеров. Пожалуй, в 5S рРНК природа достигла предела концентрации функциональных сайтов и разнообразия взаимодействий. На их фоне все более загадочной представляется та роль, которую подобная молекула может играть в клетке. Вопросам функции 5S рРНК в рибосоме посвящен следующий раздел настоящего обзора.

#### V. ФУНКЦИИ 5S рРНК

В 1971 г. появилась первая работа, касающаяся проблемы функции 5S рРНК в трансляции [11]. В ней авторы продемонстрировали, что рибосома *E. coli*, собранная в отсутствие 5S рРНК, не способна осуществлять синтез полипептида. Таким образом, 5S рРНК является крайне важным компонентом рибосомы не только в структурном, но и в функциональном отношении [84]. Однако вопрос о конкретном участии 5S рРНК в тех или иных процессах трансляционного эпикцикла долгое время оставался и поныне остается открытым. Локализация 5S рРНК в составе большой субчастицы уникальна. Благодаря многочисленным прямым (РНК–РНК) и опосредованным (РНК-белковым и белок-белковым) взаимодействиям, она имеет контакты практически со всеми важнейшими функциональными областями рибосомы: А- и Р-сайтами, пептидилтрансферазным центром, «ГТФазным центром». Столь близкое положение 5S рРНК к этим центрам вызвало появление большого количества разнообразных гипотез, касающихся функций этой молекулы. Основные из них – это посредничество в переносе растущего полипептида через образование ковалентной связи [85, 86], ГТФазная активность 5S рРНК-белкового комплекса [87, 88], позиционирование тРНК за счет спаривания консервативных участков обеих молекул [89, 90]. Но ни одно из этих предположений в итоге не подтвердилось. Сегодня очевидно, что 5S рРНК напрямую не взаимодействует ни с тРНК, ни с трансляционными факторами. В связи с этим все больше исследователей склоняется к мнению, что эта молекула играет скорее регуляторно-координирующую роль, обеспечивая взаимосвязь и взаимозависимость функциональных центров рибосомы [91, 82]. В пользу этой точки зрения существует ряд аргументов как теоретического, так и экспериментального плана.

Полномасштабное исследование точечных мутантов 5S рРНК дрожжей *S. cerevisiae in vivo* (штамм, в котором отсутствует целый локус, включающий кластер генов 5S рРНК) показало существование трех районов молекулы, мутации в которых влекут за собой последствия разного характера и разной тяжести [12]. Первый из них – петля В-спираль III-петля С (в особенности их 5'-сторона) – представляет

собой, как было показано выше, сайт связывания с белком eL5. Многие мутации в этом сайте носят летальный характер, другие сильно сказываются на точности трансляции (способности к нонсенс-супрессии). Было показано, что эта область играет решающую роль в формировании контакта между субчастицами рибосомы, через белок eL5 осуществляется связь 5S рРНК с пептидил-тРНК, расположенной в Р-сайте [92]. Второй выявленный функционально важный район 5S рРНК – петля Е-спираль IV. Почти все мутации в нем летальны (в основном по причине чрезвычайно высокой частоты смещения рамки считывания). Как упоминалось выше, петля Е является сайтом связывания 5S рРНК со спиралью-38 домена II 28S рРНК (рис. 6б). Эта спираль известна также под названием «палец А-сайта» (*ASF – A-site finger*). Таким образом, 5S рРНК имеет прямой контакт еще и с А-сайтом рибосомы. Третья область, однако, не столь обширная, включает дистальную часть спирали IV и петлю D. Мутации в ней сопряжены со снижением точности трансляции или даже летальны. Этот район также участвует во взаимодействиях с большей рибосомальной РНК. Они носят весьма разнообразный характер, как это можно видеть на примере большой рибосомной субчастицы *H. marismortui*. Спираль-89 28S рРНК находится в прямом контакте со спиралью-92, которая в свою очередь взаимодействует с аминоксил-тРНК в А-сайте. Таким образом, появляется еще одна связь с этим важнейшим функциональным центром. Тот же путь через спирали-92 и 91 приводит к сарцин-рициновой петле, обеспечивая контакт 5S рРНК с «ГТФазным центром». Спираль-39, с которой также контактирует петля D, – это дополнительный выход через спираль-80 к пептидил-тРНК в Р-сайте. В итоге мы получаем систему взаимосвязанных рРНК-белковых структур, через которую возможна коммуникация между всеми основными функциональными центрами рибосомы. Разветвленная цепь взаимодействий обеспечивает конформационную подвижность этих центров, но не независимо друг от друга. Можно сказать, что каждый из них «чувствует» состояние другого и адекватно реагирует на него, что в итоге является залогом четкой, точной и последовательной работы рибосомы. И центральным, интегрирующим звеном этой цепи является 5S рРНК, на которую, таким образом, возложены функции «администратора».

Сравнительно недавно аналогичный анализ функциональной роли отдельных структурных элементов 5S рРНК дрожжей *in vivo* был проведен российскими исследователями – С.Кипарисовым и сотр. [1]. На основании полученных результатов авторы пришли к тем же выводам. Вместе с тем в этой работе существенно обогати-

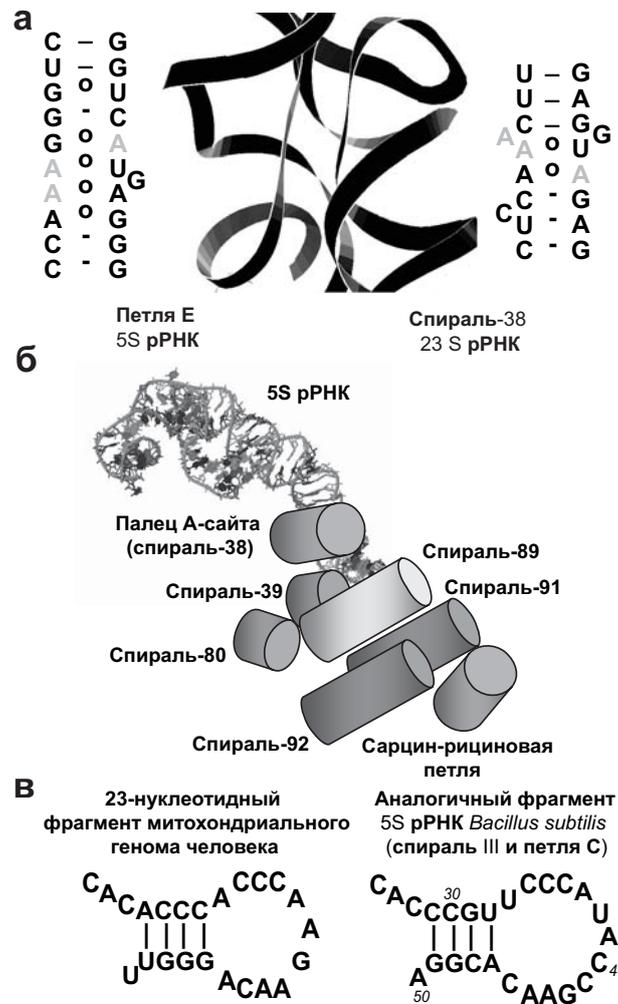


Рис. 6. Взаимодействие 5S рРНК с 23S рРНК и ее функции.

(а) Вторичная и трехмерная структуры взаимодействия между петлей E 5S рРНК и пальцем А-сайта 23S рРНК *H. marismortui* (*Jena Library*) [26, 83].

(б) Схема сети взаимодействий между доменом  $\gamma$  5S рРНК и функциональными сайтами 23S рРНК (по [12, 23]) (*Jena Library*).

(в) Вторичные структуры 23-нуклеотидного фрагмента из митохондриального генома человека и аналогичного фрагмента 5S рРНК *Bacillus subtilis* [114].

лась концепция «административной» функции 5S рРНК. Тщательный анализ искусственных мутаций и аллельных вариантов 5S рРНК позволил предположить, что множественный аллелизм 5S рРНК может сам по себе служить механизмом регуляции генной экспрессии на посттранскрипционном уровне. Различные аллельные варианты 5S рРНК обеспечивают разную точность трансляции (например, неодинаковую частоту нонсенс-супрессии), что может быть использовано эукариотической клеткой для получения минорных вариантов какого-либо белка на определенных стадиях развития. Пока это остается лишь красивой гипотезой, однако сам факт того, что, по-видимому, все эукариотические клетки обладают множественными транскрипционно активными аллелями 5S рРНК, свидетельствует о немаловажной функции, возложенной на них.

Последняя работа в этой области [93] выявила существование четкой взаимосвязи между конформационными переходами 5S рРНК и трансляционной активностью рибосомы. Например, рибосомы с 5S рРНК, третичная структура которых была изменена и зафиксирована в результате связывания с N<sup>1</sup>-азидобензамидиноспермином, демонстрируют более эффективное связывание тРНК, повышенную пептидилтрансферазную активность и транслокацию. Интересно, что под действием этого агента наиболее серьезным изменениям подвергаются петля А, которая, как было отмечено, в первую очередь ответственна за общую геометрию молекулы. Ее структура разрыхляется, позволяя предполагать возможность изменения типа стэкинга между доменами.

## VI. ИМПОРТ 5S рРНК В МИТОХОНДРИИ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Пути перемещения 5S рРНК в эукариотической клетке достаточно сложны (см. рис. 2), а для высших позвоночных они носят еще более запутанный характер [94]. В 1994 г. появилось сообщение о том, что в препарате нуклеиновых кислот, выделенных из митохондрий клеток быка, при электрофорезе в денатурирующем полиакриламидном геле обнаруживается большое количество РНК, по размеру соответствующей цитозольной 5S рРНК. Ее представленность в матриксе была выше, чем любой митохондриальной тРНК, а последовательность оказалась идентичной 5S рРНК, кодируемой ядерным геномом. Аналогичные данные были получены для митохондрий клеток кролика и курицы. С помощью различных методов авторы показали, что препарат не загрязнен цитозольными РНК. Таким образом, эта РНК

(гены которой находятся исключительно в ядре) должна быть импортирована в митохондрии из цитозоля.

К моменту этого открытия и в последующие годы накопилось большое количество сообщений об импорте в митохондрии самых разных организмов тех или иных видов РНК. Так, импорт тРНК был обнаружен у трипаносоматид (*Leishmania*, *Trypanosoma*) [95–99], *Tetrahymena* [100], ряда растений [101–105], сумчатых млекопитающих [106], а также у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* [107]. В митохондрии клеток человека также проникает, по крайней мере, одна РНК – компонент рибонуклеазы MRP [108]. О присутствии в митохондриях мышей и человека РНК, по размеру сходной с 5S рРНК, также сообщалось ранее [109, 110], однако ни последовательность нуклеотидов, ни ее четкая локализация не были установлены. Поэтому работа Йошионари и сотр. [94] считается первым достоверным сообщением об этом факте. Открытие японских исследователей позднее было подтверждено в другой работе [111], исключившей всякую возможность иной интерпретации экспериментальных данных: 5S рРНК, кодируемая ядерной ДНК, действительно присутствует в митохондриях млекопитающих.

Для изучения процесса проникновения 5S рРНК в митохондрии человека в нашей лаборатории была разработана *in vitro* система импорта радиоактивно меченных 5S рРНК в изолированные митохондрии [112]. С ее помощью удалось показать, что импорт 5S рРНК требует присутствия АТФ, системы его регенерации (например, фосфоенолпируват/пируваткиназа), интактного аппарата импорта предшественников митохондриальных белков и, по крайней мере, двух пока еще не идентифицированных цитозольных белковых факторов, участвующих в связывании и направлении 5S рРНК к митохондриям.

Ряд параметров системы *in vitro* можно варьировать в зависимости от целей, которые ставит перед собой исследователь. Использование различных белковых фракций или индивидуальных белков позволяет оценивать их способность направлять/подавлять импорт и делать определенные выводы о характере участия тех или иных белковых факторов в процессе импорта. Введение в качестве субстрата мутантных вариантов 5S рРНК (с измененной структурой отдельных модулей) необходимо для поиска детерминант импорта, то есть тех элементов структуры РНК, которые обеспечивают ее взаимодействие с факторами импорта и специфическое включение в митохондрии. Ценность существования *in vitro* системы, адекватно моделирующей процесс импорта *in vivo*, становится особенно очевидной, если вспом-

нить, что 5S рРНК кодируется множественными генами, что практически исключает возможность применения генетических подходов для поиска детерминант импорта.

Как можно использовать импорт 5S рРНК? Фактически рассматриваемая РНК представляет собой естественный эндогенный вектор, направленнно перемещающийся в митохондрии. Можно предположить (и в настоящее время эта гипотеза активно разрабатывается), что он способен переносить в своем составе гетерологичные последовательности в виде инсерций или концевых удлинений, конечно, в том случае, если они не нарушают детерминант импорта и элементов, необходимых для эффективной экспрессии, процессинга и экспорта 5S рРНК.

Направленное введение определенных РНК в митохондриальный матрикс может сыграть большую роль в изучении процессов экспрессии и репликации генома органеллы. Этот же принцип может быть положен в основу прикладного использования импорта. К примеру, ряд наследственных заболеваний вызывается мутациями в митохондриальной ДНК, причем в клетке могут присутствовать в разных соотношениях митохондрии как с нормальным, так и с мутантным геномом (явление *гетероплазмии*). Введение в «большие» митохондрии РНК, комплементарной области мутации, может существенно снизить эффективность репликации мутантной ДНК, так как образующийся ДНК–РНК дуплекс (более прочный, чем ДНК–ДНК) препятствует продвижению репликативного комплекса. Таким образом, митохондрии с ДНК дикого типа получают селективное преимущество перед своими мутантными «собратьями», что, в конечном счете, должно привести к элиминированию последних и «оздоровлению» митохондриальной популяции.

#### ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ 5S рРНК В МИТОХОНДРИЯХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Давно было известно, что рибосомы митохондрий (миторибосомы) животных обладают достаточно своеобразным набором белков и РНК. Первые лишь отчасти гомологичны прокариотическим рибосомальным белкам (для «другой части» очевидных гомологов нет ни у одних известных организмов), вторые примерно вдвое короче их бактериальных гомологов (коэффициенты седиментации митохондриальных рРНК – 16S и 12S, соответственно, в случае млекопитающих), но самое главное – полностью отсутствует 5S рРНК. Каким образом миторибосомы функционируют без этого важнейшего компонента, до сих пор не вполне ясно. Известно, что большая часть «утраченной» рРНК в миторибосомах замещена рибосомальными

белками (по этой причине соотношение РНК : белок в миторибосомах носит обращенный характер – примерно 1 : 3 [112]), однако, похоже, ни один из них не может восполнить «потерю» 5S рРНК. Количественная оценка содержания 5S рРНК в митохондриях человека, выполненная в нашей лаборатории [113], показала, что число копий этой РНК примерно соответствует числу миторибосом, что не противоречит возможности участия цитозольной 5S рРНК в формировании функциональных митохондриальных рибосомных частиц. Однако до сих пор не появилось ни одного сообщения об обнаружении 5S рРНК в препаратах миторибосом млекопитающих. Возможно, эта ассоциация носит весьма лабильный характер, но пока это остается лишь предположением.

Косвенно оно подтверждается несколькими фактами. Так, в геноме человеческих митохондрий в своем типичном контексте (в кластере генов рРНК) обнаружена рудиментарная последовательность длиной 23 нуклеотида, гомологичная участку 5S рРНК бактериального типа [114]. Интересно, что этот «рудимент» практически идентичен спирали III и петле С грамположительных бактерий (рис. 6в). Возможно, некие предковые формы митохондрий млекопитающих содержали полный набор рРНК, но в процессе эволюции он претерпел существенную редукцию. При этом 5S рРНК либо полностью исчезла (причем до самого последнего момента сохранился ее важнейший структурный элемент – сайт взаимодействия с белком L18), либо была заменена на импортируемую цитозольную 5S рРНК.

Кроме того, во всех митохондриях позвоночных присутствует белок MRP-L18, проявляющий отчетливую гомологию бактериальному рибосомальному белку L18 [115, 116]. Учитывая, что это главный и абсолютно универсальный 5S рРНК-связывающий белок, а сайты взаимодействия с белками eL5/L18-семейства сходны для 5S рРНК разного происхождения, можно всерьез задаться вопросом, какую роль этот фактор играет в миторибосомах в отсутствие своего традиционного партнера. Остается надеяться, что дальнейшие исследования позволят решить и эту загадку.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня известны десятки разных типов РНК, отличающихся друг от друга по строению, локализации, характеру взаимодействия с другими биологическими молекулами, и, наконец, по выполняемым функциям, число которых, как показали исследования последнего

десятилетия, существенно выходит за рамки «классической триады» мРНК–тРНК–рРНК. Несмотря на весьма ограниченный набор мономеров, структуры РНК поражают своим разнообразием и сложностью, подчас не уступая таковым белковых молекул. Этим обусловлен широчайший круг процессов, центральными участниками которых являются именно молекулы РНК, процессов, связанных с основой метаболизма любой живой системы, – воспроизведением и реализацией генетической информации.

В свете недавних открытий новых типов малых некодирующих РНК особенно удивительным выглядит тот факт, что хорошо знакомая каждому из школьных учебников молекула 5S рибосомальной РНК, несмотря на почти сорокалетнюю историю изучения, оказывается, возможно, наиболее загадочным представителем РНК-мира. Действительно, подробное изучение строения этой сравнительно небольшой молекулы показывает, что она отличается необыкновенно высоким уровнем сложности организации, включающим целый ряд разнообразных неканонических элементов. В этой молекуле обнаружены необычные структуры и взаимодействия, в ней сочетаются самые неожиданные варианты укладки – от классической двойной спирали А-формы до петли Е, которая, кажется, разрушает не только принцип комплементарного спаривания, но и куда более универсальный «закон» антипараллельности цепей. Многие из этих элементов, встречающихся и в других РНК, играют ключевую роль в самых разнообразных процессах. Другие же, по-видимому, уникальны для 5S рРНК.

Удивительно, что несмотря на многочисленные детальные исследования взаимодействий 5S рРНК с белками и РНК, до сих пор окончательно не выяснена основная функция этой молекулы. Необходимый компонент практически любой рибосомы, структура которого проявляет высочайший уровень консервативности, 5S рРНК, очевидно, играет важную роль в процессе трансляции. Однако все попытки связать 5S рРНК с какой-либо конкретной стадией элонгационного цикла оказались неудачными. В последние годы на смену гипотезе о существовании какой-то строго очерченной, конкретной функции 5S рРНК приходит представление о ее многофункциональности, помещающее эту молекулу на перекресток основных трансляционных процессов. Эта малая РНК может координировать работу разных функциональных сайтов рибосомы, выступая в качестве регуляторного звена, в котором нуждается любая сложная система.

Однако этим перечень уникальных свойств 5S рРНК не исчерпывается. Сложная схема внутриклеточных перемещений заметно выде-

ляет ее среди других представителей этого класса молекул. Тройственная локализация (ядро, цитозоль и митохондрии) 5S рРНК обеспечивается взаимодействиями с разнообразными белковыми факторами-переносчиками, лишь часть из которых идентифицирована. Если наши знания о функции 5S рРНК в цитозоле приобретают все более определенный характер, то ее роль в митохондриях остается загадочной и даже, можно сказать, интригующей.

Митохондриальные рибосомы животных, по-видимому, не содержат никакой 5S рРНК-подобной молекулы, стабильно ассоциированной с большой рибосомной субчастицей. Митохондриальный геном также лишен гена 5S рРНК. Вместе с тем главный и абсолютно универсальный 5S рРНК-связывающий рибосомальный белок L18 присутствует в центральном протуберанце миторибосом млекопитающих. Участвует ли кодируемая ядерным геномом 5S рРНК в митохондриальной трансляции или осуществляет какую-то иную функцию, пока неясно. Остается надеяться, что на все эти вопросы ответы будут получены в самое ближайшее время.

Авторы выражают огромную признательность О.А.Колесниковой за помощь в подготовке материала обзора и всестороннюю поддержку.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kiparisov, S., Petrov, A., Meskauskas, A., Sergiev, P.V., Dontsova, O.A., Dinman, J.D. (2005) *Mol. Gen. Genomics*, **274**, 235–247.
2. Studnicka, G.M., Eiserling, F.A., and Lake, J.A. (1981) *Nucl. Acids Res.*, **9**, 1885–1904.
3. Toots, I., Metspalu, A., Villems, R., and Saarma, M. (1981) *Nucl. Acids Res.*, **9**, 5331–5343.
4. Nishikawa, K., and Takemura, S. (1977) *J. Biochem.*, **81**, 995–1003.
5. Delihias, N., and Andersen, J. (1982) *Nucl. Acides Res.*, **10**, 7323–7344.
6. Pelham, H.R.B., and Brown, D.D. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4170–4174.
7. Steitz, J.A., Berg, C., Hendrick, J.P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J., and Yario, T. (1988) *J. Cell Biol.*, **106**, 545–556.
8. Rudt, F., and Pieler, T. (1996) *EMBO J.*, **15**, 1383–1391.
9. Picard, B., and Wegnez, M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 241–245.
10. Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A., and Barciszewski, J. (2003) *Biochem. J.*, **371**, 641–651.
11. Erdmann, V.A., Fahnestock, S., Higo, K., and Nomura, M. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2932–2936.
12. Smith, M.W., Meskauskas, A., Wang, P., Sergiev, P.V., and Dinman, J.D. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8264–8275.
13. Wagner, R., and Garrett, R.A. (1978) *Nucl. Acids Res.*, **5**, 4065–4075.
14. Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A., and Barciszewski, J. (2000) *Mol. Biol. Evol.*, **17**, 1194–1198.

15. White, S.A., Nilges, M., Huang, A., Brunger, A.T., Moore, P.B. (1992) *Biochemistry*, **31**, 1610.
16. Raue, H.A., Lorenz, S., Erdmann, V.A., and Planta, R.J. (1981) *Nucl. Acids Res.*, **9**, 1263–1269.
17. Lee, Y., and Nazar, R.N. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 6635–6641.
18. Andersen, J., and Delilhas, N. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 2912–2917.
19. Peattie, D.A., Douthwaite, S., Garrett, R.A., and Noller, H.F. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7331–7335.
20. Xiong, Y., Sundaralingam, M. (2000) *RNA*, **6**, 1316.
21. Nishikawa, K., and Takemura, S. (1978) *J. Biochem.*, **84**, 259–266.
22. Lescoute, A., Leontis, N.B., Massire, C., and Westhof, E. (2005) *Nucl. Acids Res.*, **33**, 2395–2409.
23. Chow, C.S., Hartmann, K.M., Rawling, S.L., Huber, P.W., and Barton, J.K. (1992) *Biochemistry*, **31**, 3534–3542.
24. Bullerwell, C.E., Schnare, M.N., and Gray, M.W. (2003) *RNA*, **9**, 287.
25. Huber, P. W., Rife, J. P., Moore, P. B. (2001) *J. Mol. Biol.*, **312**, 823.
26. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 905–920.
27. Bruenger, E., Kowalak, J.A., Kuchino, Y., Mc Closkey, J.A., Mizushima, H., Stetter, K.O., and Brunel, C., Romby, P., Westhof, E, Ehresmann, C., Ehresmann, B. (1991) *J. Mol. Biol.*, **221**, 293–308.
28. Kiprekar, F., Douthwaite, S., and Roepstorff, P. (2000) *RNA*, **6**, 296–306.
29. Miyazaki, M. (1974) *J. Biochem.*, **75**, 1407–1410.
30. Helm, M. (2006) *Nucl. Acids Res.*, **34**, 721–733.
31. Douthwaite, S., Garrett, R.A., Wagner, R., and Feunteun, J. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **6**, 2453–2470.
32. Ciesiolka, J., and Krzyzosiak, W.J. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **39**, 319–328.
33. Sarzynska, J., Kulinski, T., and Nilsson, L. (2000) *Biophys. J.*, **79**, 1213–1227.
34. Barthel, A., and Zacharias, M. (2006) *Biophys. J.*, **90**, 2450–2462.
35. Barciszewska, M.Z., Wyszko, E., Bald, R., Erdmann, V.A., and Barciszewski, J. (2003) *J. Biochem.*, **133**, 309–315.
36. Correll, C.C., Freeborn, B., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (1997) *Cell*, **91**, 705–712.
37. Leontis, N.B., and Westhof, E. (1998) *RNA*, **4**, 1134–1153.
38. Réblovč, K., Špakovč, N., Štefl, R., Csaszar, K., Koa, J., Leontis, N.B., and Šponer, J. (2003) *Biophys. J.*, **84**, 3564–3582.
39. Lukavsky, P., Billeci T.M., James, T.L. Schmitz, U. (1997) In: Leontis, N.B., Santa Lucia, J., eds. *Molecular modelling of nucleic acids*. Washington, DC: American Chemical Society. pp 122–149 (ссылка по Leontis and Westhof, 1998).
40. Lentzen, G., Moine, H., Ehresmann, B., Wintermeyer, W. (1996) *RNA*, **2**, 244–253.
41. Wimberly, B., Varani, G., and Tinoco, I, Jr. (1993) *Biochemistry*, **32**, 1078–1087.
42. Correll, C.C., Beneken, J., Plantinga, M.J., Lubbers, M., and Chan, Y.-L. (2003) *Nucl. Acids Res.*, **31**, 6806–6818.
43. Branch, A.D., Benenfeld, B.J., and Robertson, H.D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6590–6594.
44. Baumstark, T., Schröder, A.R.W., and Riesner, D. (1997) *EMBO J.*, **16**, 599–610.
45. Weidner, H., and Crothers, D.M. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3401–3414.
46. Kime, M.J., and Moore, P.B. (1982) *Nucl. Acids Res.*, **10**, 4973–4983.

47. Goringer, H.U., Szymkowiak, C., and Wagner, R. (1984) FEBS J. (EJB), **144**, 25–34.
48. Kao, T.H., and Crothers, D.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 3360–3364.
49. Toots, I., Misselwitz, R., Bohm, S., Welfle, R., Villems, R., and Saarma, M. (1982) Nucl. Acids Res., **10**, 3381–3389.
50. Maruyama, S., and Sugai, S. (1980) J. Biochemistry, **88**, 151–158.
51. Giegerich, R., Haase, D., Rehmsmeier, M. (1999) Pacific Symposium on Biocomputing, 126–137.
52. Hanas, J.S., Bogenhagen, D.F., and Wu, C.W. (1984) Nucl. Acids Res., **12**, 2745–2758.
53. Huber, P.W., and Wool, I.G. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 1593–1597.
54. Rawling, S.L., Matt, G.D., and Huber, P.W. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 869–877.
55. Darsillo, P., and Huber, P.W. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 21075–21082.
56. Baudin, F., Romaniuk, P.J., Romby, P., Brunel, C., Westhof, E., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1991) J. Mol. Biol., **218**, 69–81.
57. Theunissen, O., Rudt, F., and Pieler, T. (1998) Eur. J. Biochemistry, **258**, 758–767.
58. Lu, D., Searles, M.A., Klug, A. (2003) Nature, **426**, 96–100.
59. McDougall, J., and Wittmann-Liebold, B. (1994) Eur. J. Biochem., **221**, 779–785.
60. Huber, P. W., and Wool, I.G. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 322–326.
61. Gongadze, G.M., Perederina, A.A., Meshcheryakov, V.A., Fedorov, R.V., Moskalenko, S.E., Rak, A.V., Serganov, A.A., Shcherbakov, D.V., Nikonov, S.V., and Garber, M.B. (2001) Mol. Biol., **35**, 521–526.
62. Bear, D.G., Schleich, T., Noller, H.F., and Garrett, R.A. (1977) Nucl. Acids Res., **4**, 2511–2526.
63. Nazar, R.N., Willick, G.E., and Matheson, A.T. (1979) J. Biol. Chem., **254**, 1506–1512.
64. Nishikawa, K., and Takemura, S. (1974) FEBS Lett., **40**, 106–109.
65. Blobel, G. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 1881–1885.
66. Isoda, N., Tanaka, T., and Ishikawa, K. (1981) J. Biochem., **90**, 551–554.
67. Aoyama, K., Tanaka, T., Hidaka, S., and Ishikawa, K. (1984) J. Biochem., **95**, 1179–1186.
68. Scripture, J.B., and Huber, P.W. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 27358–27365.
69. Yeh, L.-C. C., Horowitz, P.M., and Lee, J.C. (1988) J. Biol. Chem., **263**, 17412–17417.
70. Lin, E., Lin, S.-W., and Lin, A. (2001) Nucl. Acids Res., **29**, 2510–2516.
71. DiNitto, J.P., and Huber, P.W. (2003) J. Mol. Biol., **330**, 979–992.
72. Williamson, J.R. (2000) Nature Struct. Biol., **7**, 834–837.
73. Tompa, P., and Csermely, P. (2004) FASEB J., **18**, 1169–1175.
74. Shpanchenko, O. V., Dontsova, O. A., Bogdanov, A. A., and Nierhaus, K. H. (1998) RNA, **4**, 1154–1164.
75. Spierer, P., Bogdanov, A.A., and Zimmermann, R.A. (1978) Biochemistry, **17**, 5394–5398.
76. Perederina, A., Nevskaya, N., Nikonov, O., Nikulin, A., Dumas, P., Yao, M., Tanaka, I., Garber, M., Gongadze, G., and Nikonov, S. (2002) RNA, **8**, 1548–1557.
77. Nakashima, T., Yao, M., Kawamura, S., Iwasaki, K., Kimura, M., and Tanaka, I. (2001) RNA, **7**, 692–701.
78. Korepanov, A.P., Gongadze, G.M., and Garber, M.B. (2004) Biochemistry, **69**, 607–611.
79. Stoldt, M., Wühnert, J., Görlach, M., and Brown, L.R. (1998) EMBO J., **17**, 6377–6384.

80. Stoldt, M., Wöhnert, J., Ohlenschläger, O., Görlach, M., and Brown, L.R. (1999) *EMBO J.*, **18**, 6508–6521.
81. Dontsova, O., Tishkov, V., Dokudovskaya, S., Bogdanov, A., Döring, T., Rinke-Appel, J., Thamm, S., Greuer, B., and Brimacombe, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4125–4129.
82. Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Shpanchenko, O., Bogdanov, A., and Brimacombe, R. (1996) *RNA*, **2**, 146–152.
83. Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4899–4903.
84. Dohme, F., and Nierhaus, K.H. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2221–2225.
85. Raacke, I.D. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2357–2360.
86. Fahnestock, S.R., and Nomura, M. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 363–365.
87. Horne, J.R., and Erdmann, V.A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2870–2873.
88. Ogata, K., Terao, K., and Uchiumi, T. (1980) *J. Biochem.*, **87**, 517–524.
89. Forget, B. G.; Weissman, S. M. (1967) *Science*, **158**, 1695–1699.
90. Pace, B., Matthews, E.A., Johnson, K.D., Cantor, C.R., and Pace, N.R. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 36–40.
91. Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A., Dokudovskaya, S.S., Lavrik, I.N. (1995) *Biochem. Cell. Biol.*, **73**, 869–876.
92. Meskauskas, A., and Dinman, J.D. (2001) *RNA*, **7**, 1084–1096.
93. Kouvela, E.C., Gerbanas, G.V., Xaplanteri, M.A., Petropoulos, A.D., Dinos, G.P., and Kalpaxis, D.L. (2007) *Nucl. Acids Res.*, 1–12.
94. Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K., and Watanabe, K. (1994) *FEBS Lett.*, **338**, 137–42.
95. Simpson, A.M., Suyama, Y., Dewes, H., Campbell, D.A., and Simpson, L. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 5427–5444.
96. Lye, L.-F., Tom Chen, D.-H., and Suyama, Y. (1993) *Mol. Biochem. Parasitology*, **58**, 233–246.
97. Mottram, J.C., Bell, S.D., Nelson, R.G., and Barry, J.D. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 18313–18317.
98. Hancock, K., LeBlanc, A.J., Donze, D., and Hajduk, S.L. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23963–23971.
99. Schneider, A., Martin, J., and Agabian, N. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2317–2322.
100. Rusconi, C.P., and Cech, T.R. (1996) *EMBO*, **15**, 3286–3295.
101. Akashi, K., Sakurai, K., Hirayama, J., Fukuzawa, H., Ohyama, K. (1996) *Curr. Genet.*, **30**, 181–185.
102. Brubacher-Kauffmann, S., Maréchal-Drouard, L., Cosset, A., Dietrich, A., and Duchkne, A.-M. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2037–2042.
103. Glover, K.E., Spencer, D.F., and Gray, M.W. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 639–648.
104. Chen, H.-C., Viry-Moussand, M., Dietrich, A., and Wintz, H. (1997) *Biochem. and Biophys. Research Comm.*, **237**, 432–437.
105. Maréchal-Drouard, L., Weil, J.-H., and Guillemaut, P. (1988) *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4777–4788.
106. Dörner, M., Altmann, M., Pööbo, S., and Mörl, M. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2688–2698.
107. Martin, R.P., Schneller, J.M., Stahl, A.J., and Dirheimer, G. (1979) *Biochemistry*, **18**, 4600–4605.

108. Puranam, R.S., and Attardi, G. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 548–561.
109. Wong, T.W., and Clayton, D.A. (1986) *Cell*, **45**, 817–825.
110. King, M.P., and Attardi, G. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 10228–10237.
111. Magalhães, P.J., Andreu, A.L., and Schon, E.A. (1998) *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2375–2382.
112. Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A., and Watanabe, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 21724–21736.
113. Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P., and Tarasov, I.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 45642–45653.
114. Nierlich, D.P. (1982) *Mol. Cell Biol.*, **2**, 207–209.
115. O'Brien, T.W., Liu, J., Sylvester, J.E., Mougey, E.B., Fischel-Ghodsian, N., Thiede, B., Wittmann-Liebold, B., and Graack, H.-R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**: 18153–18159.
116. Koc, E.C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M.B., Schlatzer, D.M., Moseley, A., and Spremulli, L.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 43958–43969.
117. Lescoute, A., and Westhof, E. (2006) *RNA*, **23**, 83–93.