

## СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АНАТОМИЯ СИГНАЛУЗНАЮЩЕЙ ЧАСТИЦЫ: ОТ БАКТЕРИЙ ДО МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2007 г. О. Н. КОВАЛЬСКАЯ, П. В. СЕРГИЕВ,  
А. А. БОГДАНОВ, О. А. ДОНЦОВА

*Кафедра химии природных соединений химического факультета  
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Строение и функция SRP и SR из клеток животных. III. Строение и функция SRP и SR из клеток *S. cerevisiae*. IV. Строение и функция SRP и SR из клеток *E. coli*. V. Сходства и различия SRP и SR из клеток млекопитающих, *S. cerevisiae* и *E. coli*. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Транспорт белков – один из важнейших процессов в жизнедеятельности клетки. Транслокация белков через мембрану может осуществляться различными путями. Посттрансляционный транспорт белков происходит после завершения синтеза полной полипептидной цепи и требует участия шаперонов. Альтернативный путь транслокации протекает котрансляционно. Такой тип транслокации характерен для

---

*Принятые сокращения:* ER – endoplasmic reticulum, эндоплазматический ретикулум; SRP – signal recognition particle, сигналузнающая частица; SRP' – signal recognition protein, сигналузнающий белок; SR – SRP-receptor, рецептор SRP; GMPPNP – гуанозин-5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -имида)трифосфат; GMPPCP – гуанозин-5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -метилена)трифосфат; ХТР – ксантозин-5'-трифосфат; ХМPPNP – ксантозин-5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -имида)трифосфат; GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцирующий белок; WGS – wheat germ system, система трансляции *in vitro* белков из ростков пшеницы; TF – trigger factor, фактор-переключатель; GAP – GTPase activating protein, белок-активатор GTPазной реакции; GEF – guanine nucleotide exchange factor, фактор обмена нуклеотидов; TMC – трансмембранный сегмент; IBD – insertion box domain, внутренний домен-вставка; EF-G – elongation factor G, элонгационный фактор G.

*Адрес для корреспонденции:* petya@genebee.msu.su

Работа выполнена при поддержке грантов: РФФИ 04-06-49505а, ННМИ 55005605, МН контракт N 02.445.11.7298.

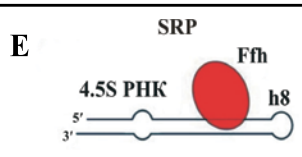
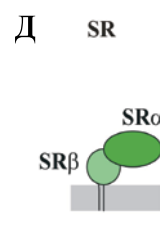
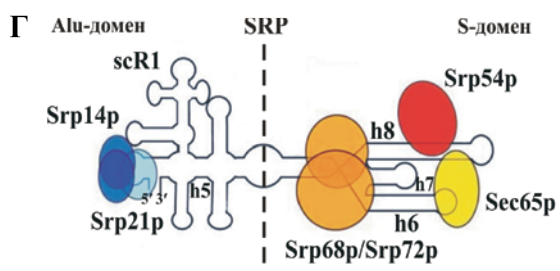
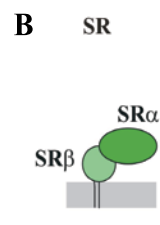
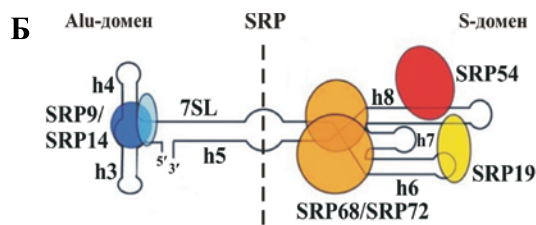
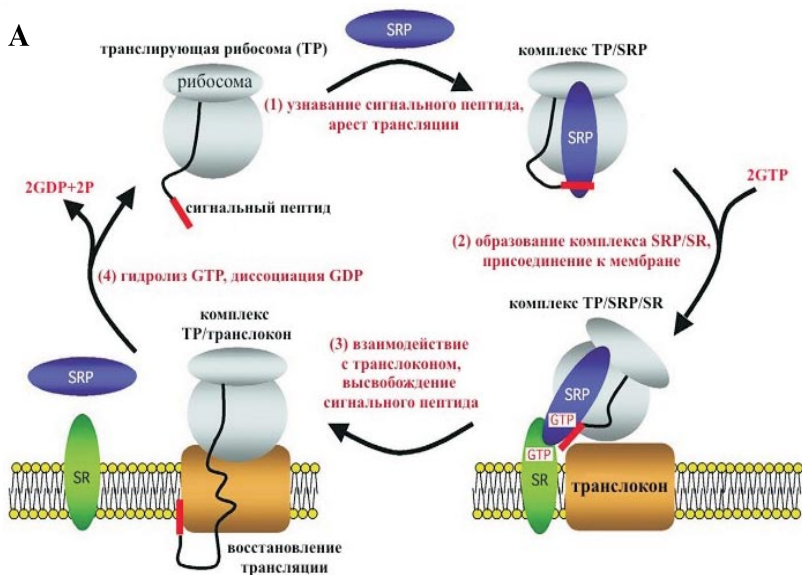
белков, транспортируемых из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум (endoplasmic reticulum, ER), и является важным этапом в биогенезе многих белков, включая секреторные и некоторые мембранные белки. Основным участником котрансляционного транспорта является цитоплазматическая сигналузнающая частица (signal recognition particle, SRP). Впервые SRP была обнаружена в клетках животных [1]. Было показано, что SRP состоит из белков и молекулы 7SL РНК [1, 2]. Ее функция заключается в доставке рибосом, которые синтезируют секреторные или мембранные белки, к мембране ER для котрансляционного транспорта белков. На N-конце секреторных и мембранных белков находится специфическая последовательность, которая несет сигнал для присоединения к мембране.

SRP взаимодействует с рибосомой и сигнальной последовательностью белка, после выхода ее из рибосомного туннеля (рис. 1, А). Это взаимодействие вызывает замедление элонгации растущей пептидной цепи (так называемый арест трансляции). Образовавшийся комплекс, состоящий из SRP, растущего пептида и рибосомы, присоединяется к мембране за счет взаимодействия SRP с мембранным SRP-рецептором (SRP-гесептор, SR). После этого SRP теряет сродство к сигнальному пептиду и рибосоме, рибосома связывается с транслокационным участком ER (так называемым транслоконом), пептид перемещается в транслокон и котрансляционная транслокация растущего пептида осуществляется через/в мембрану с нормальной скоростью [3].

Открытие SRP в клетках дрожжей [4] и бактерий [5, 6] позволило говорить о существовании универсального пути котрансляционного транспорта белков во всех организмах, а также сравнить структуру и особенности функционирования SRP из разных источников. SRP *Saccharomyces cerevisiae* имеет некоторые структурные сходства и отличия [7] от SRP из клеток животных. Однако, схема работы SRP *S. cerevisiae* полностью совпадает со схемой функционирования SRP из клеток животных: дрожжевая SRP способна узнавать растущий сигнальный пептид, экспонированный на рибосоме, взаимодействовать с рибосомой, вызывать остановку трансляции и взаимодействовать с  $\alpha$ -субъединицей SR в присутствии GTP с

Рис. 1. Схематическое изображение SRP-зависимого котрансляционного транспорта белков и компонентов SRP и SR из разных организмов.

А – Схема SRP-зависимого котрансляционного транспорта белков (цитировано по [13]). Схематическое изображение компонентов SRP из клеток животных (Б), SR из клеток животных (В), SRP *S. cerevisiae* (Г), SR *S. cerevisiae* (Д), SRP *E. coli* (Е), SR *E. coli* (Ж).



последующим высвобождением пептида и восстановлением трансляции белка на рибосоме [3, 8].

В бактерии *Escherichia coli* SRP содержит только два компонента: белок Ffh и молекулу 4.5S РНК, и представляет собой так называемую «минимальную» SRP [5, 6]. Роль SR выполняет его структурный и функциональный гомолог – белок FtsY [9]. SRP *E. coli* способна узнавать сигнальный пептид и взаимодействовать с белком FtsY [9, 10] и рибосомой [11, 12]. В настоящем обзоре представлены данные по структуре некоторых компонентов SRP из разных организмов и комплексов SRP с рибосомой, а также приведены функциональные характеристики отдельных компонентов SRP и SR.

## II. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИЯ SRP И SR ИЗ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

Поскольку SRP впервые была выделена из клеток животных, то мы начнем обзор с описания именно эукариотической SRP. Еще на ранних этапах изучения SRP было показано, что это компактная частица продолговатой формы с коэффициентом седиментации 11S [1]. SRP состоит из шести белков, которые получили свои названия в соответствии с их молекулярными массами: SRP72, SRP68, SRP54, SRP19, SRP14, SRP9, и молекулы 7SL РНК длиной около трехсот нуклеотидных остатков (рис. 1, Б) [1, 2]. В составе SRP можно выделить малый (или Alu-) и большой (или S-) домены, разделенные подвижным адаптером. Дальнейшее изучение структуры SRP с использованием биохимических подходов и данных электронной микроскопии позволило определить основные участки взаимодействия 7SL РНК и белков в составе SRP. Alu-домен частицы образован третьей, четвертой и частично пятой спиралями 7SL РНК и гетеродимером SRP9/SRP14, S-домен содержит шестую, седьмую, восьмую и частично пятую спирали молекулы 7SL РНК, а также белки SRP19, SRP54 и гетеродимер SRP68/SRP72 [13].

SR из клеток животных также хорошо изучен. SR представляет собой комплекс двух белков:  $\alpha$ -субъединица SR представляет собой периферический мембранный белок,  $\beta$ -субъединица SR является мембранным белком и взаимодействует с  $\alpha$ -субъединицей SR через свой цитоплазматический домен (рис. 1, В) [13].

### СТРУКТУРА 7SL РНК

Выделенная из SRP молекула РНК имела коэффициент седиментации 7S, и по первичной структуре совпала с обнаруженной ранее

молекулой 7SL РНК [2]. 7SL РНК взаимодействует с SRP белками в соотношении 1:1 [2, 14], при этом бóльшая часть РНК покрыта белками и недоступна для разрезания микрококковой нуклеазой. Клонирование и биохимическое изучение молекул 7SL РНК из разных эукариотических организмов [15–17] дало возможность предположить вторичную структуру 7SL РНК (рис. 2) в виде протяженных двойных спиралей. Предложенная структура согласовывалась с результатами химической модификации 7SL РНК [18] и оказалась высококонсервативной среди эукариот [19, 20]. Спирали h3, h4 и часть спирали h5 вместе образуют структуру, схожую со структурой Alu-РНК. Alu-РНК представляют собой транскрипты Alu-генов, а также могут входить в состав интронов и некодирующих частей генов. На сегодняшний день функция Alu-РНК неизвестна [20]. S-домен составляют спирали h6, h7, h8 и часть спирали h5. Следует отметить, что в клетке 7SL РНК транскрибируется РНК-полимеразой III [20], после окончания транскрипции к 3'-концу 7SL РНК присоединяется дополнительный остаток аденина [21, 22].

#### СТРУКТУРА Alu-ДОМЕНА SRP

Гетеродимер SRP9/SRP14 является белковым компонентом Alu-домена SRP. Белки SRP9 и SRP14 по отдельности не проявляют РНК-связывающей активности. Эти белки в отсутствие 7SL РНК образуют очень прочный гетеродимер, который способен затем связываться с РНК [23, 24]. Связывание гетеродимера происходит с Alu-участком 7SL РНК, точнее с нуклеотидными остатками 1–47 (так называемый 5'Alu-домен) и с остатками 48–64 и 283–301 (так называемый 3'Alu-домен) [25, 26]. Связывание осуществляется стехиометрически, с высокой аффинностью, независимо от других белков [14, 20, 27]. С помощью сайт-направленного мутагенеза было показано, что в обоих белках содержатся домены, важные для образования комплекса с РНК [28]. Точечные мутации высококонсервативных нуклеотидных остатков в Alu-доме 7SL РНК также нарушают образование комплекса гетеродимера SRP9/SRP14 с РНК [29].

Первая кристаллическая структура белкового компонента Alu-домена SRP была получена с использованием химерного белка мыши, содержавшего в одной полипептидной цепи последовательности белков SRP9 и SRP14 в порядке SRP14–SRP9 (рис. 3, А). Такой химерный белок способен структурно и функционально заменять гетеродимер SRP9/SRP14 [27].

Как оказалось, белки SRP9 и SRP14 структурно похожи друг на друга, оба содержат одинаковый структурный мотив  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ . В

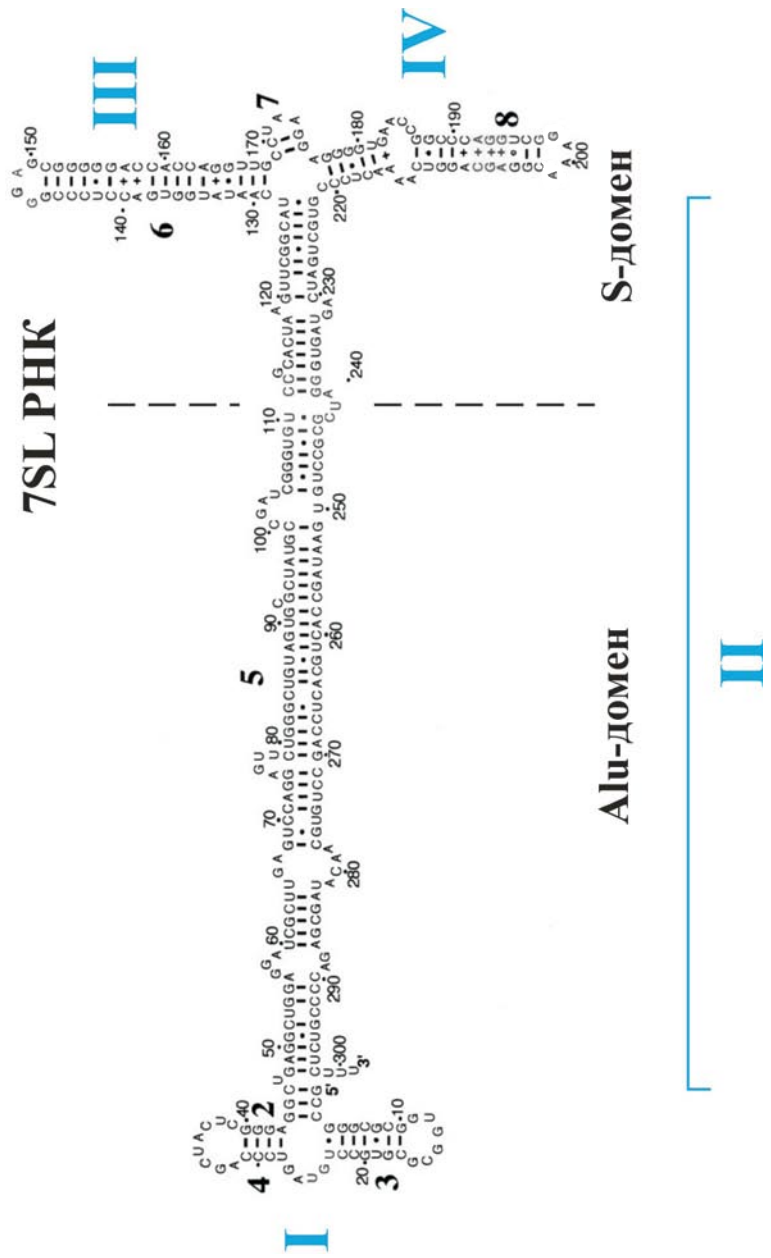


Рис. 2. Вторичная структура 7SL РНК животных [17].

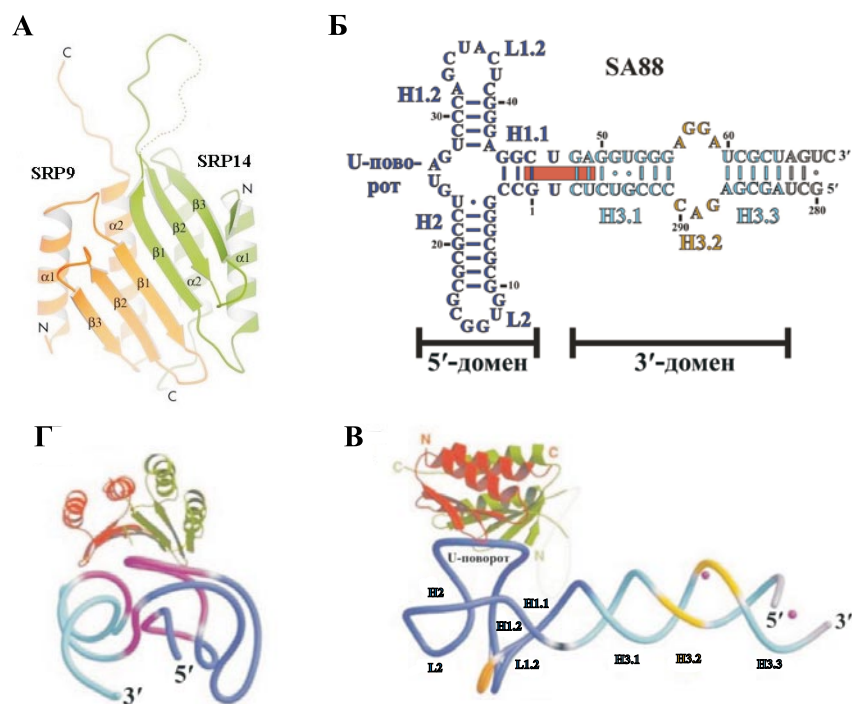


Рис. 3. Структуры компонентов Alu-домена SRP из клеток животных.

А – кристаллическая структура химерного белка SRP14-SRP9 мыши [30], Б – вторичная структура Alu-подобной РНК SA88 [32], В – кристаллическая структура комплекса гетеродимера SRP9/SRP14 человека с SA88 [32], Г – модель взаимодействия гетеродимера SRP9/SRP14 с Alu-доменом 7SL РНК [32].

составе гетеродимера они образуют общий антипараллельный шести-тяжевой  $\beta$ -лист, на выпуклой стороне которого находятся четыре  $\alpha$ -спирали, а на вогнутой стороне расположены положительно заряженные аминокислотные остатки [30].

Позднее были получены две кристаллические структуры комплекса SRP9/SRP14 из клеток человека с Alu-подобными участками РНК [31]. Первая структура, полученная с разрешением 3,2 Å, соответствовала комплексу SRP9/SRP14 с молекулой РНК длиной 50 нуклеотидных остатков (SA50), содержащей 5'-домен Alu-участка. РНК оказалась свернута в структуру псевдоузла, а гетеродимер SRP9/SRP14 взаимодействует с U-поворотом, находящимся между спиралями. Вторая структура, полученная с разрешением 4,0 Å,

представляла комплекс SRP9/SRP14 с молекулой РНК длиной 88 нуклеотидных остатков, содержавшей 3'- и 5'-домены Alu-участка (SA88) и представлявшей собой минимальный Alu-домен 7SL РНК (рис. 3, Б, В) [32]. В данном случае также наблюдали взаимодействие гетеродимера с U-поворотом в 5'-домене, и дополнительный слабый контакт с 3'-концевым доменом находящейся рядом второй молекулы РНК (комплекс SRP9/SRP14 с SA88 РНК кристаллизуется в виде димера). Полученные данные позволили авторам построить модель комплекса гетеродимера SRP9/SRP14 с Alu-доменом 7SL РНК (рис. 3, Г), причем предложенная структура хорошо согласовывалась с биохимическими данными по взаимодействию комплекса белков SRP9/SRP14 с 7SL РНК, полученными ранее [31].

Полученные кристаллические структуры, биохимические и биофизические данные позволили предложить схему сборки Alu-домена SRP. Согласно этой схеме, после образования гетеродимера комплекс SRP9/SRP14 вначале взаимодействует с U-поворотом в 5'-домене Alu-участка 7SL РНК, затем происходит связывание с 3'-доменом Alu-участка, что приводит к образованию плотной структуры Alu-домена SRP [26, 33].

#### СТРУКТУРА S-ДОМЕНА SRP

Как упоминалось ранее, S-домен SRP образован спиралью h6, h7, h8 и частью спирали h5 7SL РНК, а также белками SRP19, SRP54 и гетеродимером SRP68/SRP72.

**SRP68/SRP72.** При обработке SRP раствором с высокой ионной силой комплекс SRP68/SRP72 ведет себя как стабильный гетеродимер [14]. Этот гетеродимер способен защищать от нуклеазного разрезания довольно протяженный участок в центральной части 7SL РНК, а именно основания спиралей h6 и h8, спираль h7 и участок спирали h5 [34]. В работе [35] было показано, что белок SRP68 содержит в N-концевом участке РНК-связывающий домен и способен самостоятельно взаимодействовать с 7SL РНК. С-концевой участок SRP68 взаимодействует с белком SRP72. За взаимодействие с SRP68 отвечает N-концевой домен SRP72 [36]. Была также обнаружена способность белка SRP72 связываться с 7SL РНК. В составе С-концевого участка SRP72 был найден РНК-связывающий домен, и была детектирована область в h5 спирали 7SL РНК, с которой взаимодействует SRP72 [37]. Ассоциация белков SRP68 и SRP72 с молекулой 7SL РНК протекает независимо от SRP19, SRP54 и SRP9/SRP14 [14, 34].

**SRP19.** В экспериментах по диссоциации SRP на отдельные компоненты с последующей сборкой полноценной SRP из отдельных



компонентов было показано, что белок SRP19 независимо от других белков связывается с 7SL РНК [14]. Позднее было показано, что SRP19 взаимодействует со спиралью h6 и h8 [34, 38], причем эти взаимодействия были подтверждены с помощью мутаций в петле на конце h6 спирали [39]. Также было показано, что участок 7SL РНК, содержащий h6, h7, h8 и часть h5 спирали, необходим для связывания с SRP19, при этом основной участок связывания SRP19 с молекулой 7SL РНК находится в спирали h6 [40]. Систематический сайт-направленный мутагенез белка SRP19 показал, что примерно половина аминокислотных остатков являются важными для связывания РНК. Позднее было показано, что РНК-связывающие участки SRP19 локализованы преимущественно в N-концевой части [41, 42]. Первой была получена кристаллическая структура с разрешением 1,8 Å белка SRP19 человека в комплексе с участком спирали h6, содержащим 29 нуклеотидных остатков. Как оказалось, белок SRP19 имеет вторичную структуру  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ , которая в пространстве сворачивается в трехтяжевой антипараллельный  $\beta$ -лист, на одном конце которого находятся две  $\alpha$ -спирали. SRP19 взаимодействует непосредственно с петлей на конце спирали h6 [26, 43].

Позднее две независимые группы исследователей получили кристаллические структуры комплексов, состоявших из белка SRP19, выделенного из археобактерий *Methanococcus jannaschii*, и S-домена молекулы 7SL РНК человека длиной 128 нуклеотидных остатков (разрешение 2,9 Å) или S-домена молекулы 7SL РНК *M. jannaschii* длиной 97 нуклеотидных остатков (разрешение 2,3 Å) (рис. 4, А) [44–46]. Обе структуры очень похожи. В обоих случаях SRP19 взаимодействует с большой бороздкой в петле, находящейся на конце спирали h6, и с малой бороздкой в петле, которая находится на конце спирали h8.

**SRP54.** Структура белка SRP54 довольно хорошо изучена. В составе белка можно выделить три домена: N-концевой домен, G-домен и находящийся на C-конце M-домен, получивший свое название из-за большого количества остатков метионина [47]. G-домен содержит структурный мотив, который имеет сходства с GТ различными доменами других белков [48, 49]. В M-домене находятся РНК-связывающий участок (SRP54M взаимодействует со спиралью h8 SRP РНК) и гидрофобный участок, ответственный за связывание с сигнальным пептидом [47–53].

Была получена кристаллическая структура SRP54M человека с разрешением 2,1 Å [54]. SRP54M состоит из семи  $\alpha$ -спиралей  $\alpha 1$ – $\alpha 7$  (рис. 4, Б). Все спирали, кроме  $\alpha 1$  образуют компактную структуру, которая стабилизирована взаимодействием нескольких

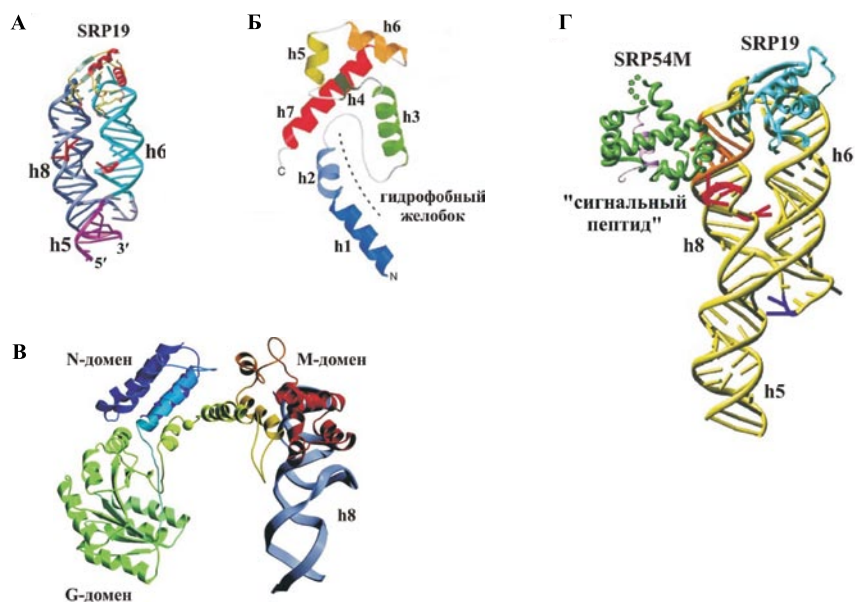


Рис. 4. Кристаллические структуры компонентов S-домена SRP из клеток животных.

А – кристаллическая структура комплекса белка SRP19 *M. jannaschii* с S-доменом 7SL РНК *M. jannaschii* [45], Б – кристаллическая структура М-домена белка SRP54 человека [54], В – кристаллическая структура комплекса белка SRP54 со спиралью h8 7SL РНК *S. solfataricus* [57], Г – кристаллическая структура комплекса SRP54M/SRP19/S-домен 7SL РНК человека [58]. Розовым цветом показана  $\alpha 1$ -спираль расположенной рядом второй молекулы М-домена SRP54. Возможно, взаимодействие SRP54M со спиралью  $\alpha 1$  второй молекулы SRP54 мимикрирует взаимодействие SRP54M в  $\alpha$ -спиралью сигнального пептида.

гидрофобных остатков, а также сеть водородных связей и солевыми мостиками. В структуре SRP54M можно выделить протяженный желоб, образованный спиральями  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  и  $\alpha 4$ . В структуре кристалла этот желоб оказывается занятым спиралью  $\alpha 1$  соседней молекулы SRP54M (белок кристаллизуется в виде димера). Вполне возможно, что данный желоб представляет собой участок SRP54M, ответственный за связывание сигнального пептида. Спирали  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  и петля между ними образуют аргинин-богатый НТН-мотив, характерный для ДНК-связывающих белков. Анализ поверхностного электростатического потенциала SRP54M показал, что аминокислотные остатки, находящиеся в НТН-мотиве и в спиральях  $\alpha 5$  и  $\alpha 7$ , могут быть вовлечены во взаимодействие с 7SL РНК. Позднее данное предположение было подтверждено экспериментально [55]. Было

показано, что мутации аминокислотных остатков в спиральных  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  и  $\alpha 7$  нарушали связывание SRP54M человека с молекулой 7SL РНК.

Помимо связывания сигнального пептида, SRP54 принимает участие во взаимодействии SRP с рибосомой. Были получены две сшивки белка SRP54 с рибосомными белками L23a и L35, которые находятся в непосредственной близости от рибосомного туннеля [56].

**Комплекс SRP54/7SL РНК.** Была получена кристаллическая структура с разрешением 4,0 Å как полноразмерного белка SRP54 *Sulfolobus solfataricus*, так и его комплекса со спиралью h8 7S РНК *S. solfataricus* [57] (рис. 4, В). Как известно, SRP архебактерий имеет несколько компонентов: 7S РНК, которая по структуре очень близка к 7SL РНК человека, и белки SRP19 и SRP54, которые ассоциированы с SRP РНК аналогичным образом [3]. Структура белка SRP54 напоминает букву «L», более протяженную часть составляет NG-домен, а более короткую – М-домен. Структура NG-домена имеет большое сходство с ранее полученной структурой NG-домена белка Ffh из *Thermus aquaticus*, детальное рассмотрение которой будет приведено ниже. М-домен белка SRP54 *S. solfataricus*, также как и М-домен белка SRP54 человека, состоит из семи  $\alpha$ -спиралей. При образовании комплекса со спиралью h8 7S РНК М-домен белка SRP54 *S. solfataricus* практически не изменяет свою структуру, происходит лишь небольшой поворот по отношению к NG-домену. Характер взаимодействия М-домена белка SRP54 *S. solfataricus* с 7S РНК аналогичен взаимодействию М-домена белка Ffh с 4.5S РНК, детальное рассмотрение которого также будет приведено ниже.

**Комплекс SRP19/SRP54/7SL РНК.** Из опытов по сборке SRP из отдельных компонентов *in vitro* стало ясно, что белок SRP54 способен связываться с 7SL РНК только при наличии белка SRP19 [14]. Причем удаление двадцати аминокислотных остатков с С-конца SRP19 уменьшает связывание с 7SL РНК самого SRP19 и соответственно снижается связывание SRP54 с комплексом SRP19(C-20)/7SL РНК [51]. Связывание NG- и М- доменов белка SRP54 с 7SL РНК или с комплексом SRP19/7SL РНК показало, что NG-домен не способен связываться ни с SRP РНК, ни с комплексом SRP19/7SL РНК. SRP54M не взаимодействует напрямую с 7SL РНК, но способен образовывать комплекс SRP54M/SRP19/7SL РНК. Полученные данные обнаруживают некоторое противоречие. Как было показано, молекула 4.5S РНК *E. coli* является структурным гомологом домена IV 7SL РНК. Также в 4.5S РНК и в домене IV 7SL РНК находятся высококонсервативные нуклеотидные остатки. Полноразмерный белок SRP54 или его М-домен, как оказалось, способны образовывать

стабильные комплексы с 4.5S РНК. Основываясь на полученных результатах, авторы выдвинули предположение, что SRP19 при связывании с 7SL РНК стабилизирует определенную конформацию РНК, с которой способен связываться М-домен белка SRP54 [51].

В работе [58] была опубликована кристаллическая структура с разрешением 3,1 Å тройного комплекса SRP54M/SRP19/S-домен 7SL РНК человека (рис. 4, Г). В комплексе НТН-мотив белка SRP54М образует контакт с малой бороздкой спирали h8 7SL РНК. В образовании этой малой бороздки принимают участие нуклеотидные остатки из симметричной А и несимметричной В внутренних петель спирали h8. При образовании комплекса SRP54М с РНК симметричная петля не изменяет своей структуры, тогда как несимметричная петля претерпевает значительные структурные перестройки: четыре нуклеотидных остатка, находящихся в стэкинг-взаимодействии друг с другом, образуют контакты с SRP54М, а два остатка аденина оказываются выпетленными и образуют контакты со спиралью h6 [46, 58].

#### СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА РИБСОМА/СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД/SRP

В последние годы был достигнут значительный прогресс в изучении взаимодействия SRP с рибосомой. С помощью криоэлектронной микроскопии с разрешением 12 Å была определена структура комплекса SRP с рибосомой, синтезирующей сигнальный пептид (рис. 5, А–В) [59]. SRP в составе комплекса имеет изогнутую форму (рис. 5, Г, Д). S-домен имеет несколько контактов с большой рибосомной субъединицей рядом с местом выхода растущего пептида из туннеля. Первый контакт осуществляет домен SRP54N; на карте электронной плотности он расположен рядом с рибосомными белками L25 (соответствует белку L23a для рибосом из проростков пшеницы) и L35 (рис. 5, Е). Это взаимодействие согласуется с полученными ранее данными фотохимического сшивания белка SRP54 с рибосомными белками L23a и L35 [56]. Вторым и третьим контактами образует М-домен белка SRP54 со спиралями H24 и H59 25S рибосомной РНК соответственно (рис. 5, Ж). Также был обнаружен контакт между S-доменом SRP РНК (спирали h5 и h8) и областью рибосомы, в которой находятся спирали 25S рРНК H98 и H99, петля между спиралями H100 и H101, белок L16 (рис. 5, З).

Контакты с Alu-доменом SRP локализованы в области рибосомы, с которой взаимодействуют элонгационные факторы. Первый контакт образован Alu-РНК с большой рибосомной субъединицей, а именно спиралью h2, петлями L2 и L1.2 7SL РНК со спиралью H43 25S рРНК

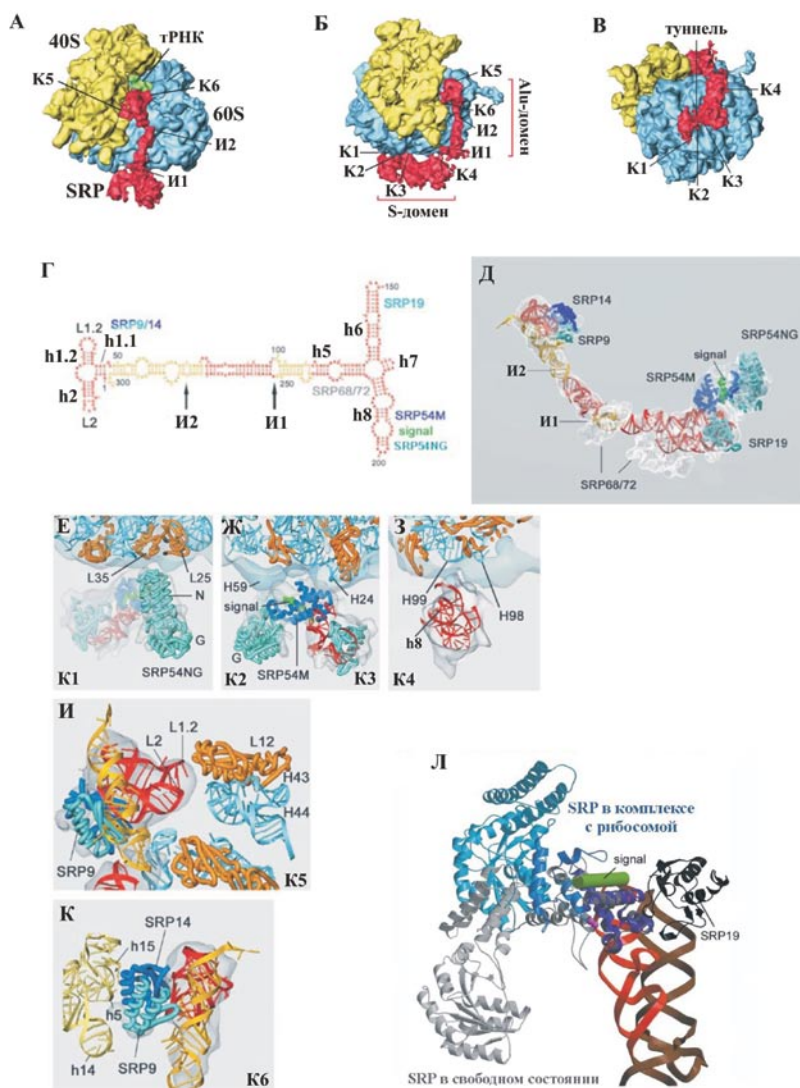


Рис. 5. Взаимодействие SRP с рибосомой [59, 61].

А, Б и В – структура комплекса SRP с рибосомой в разных проекциях, определенная с помощью криоэлектронной микроскопии. К1–К6 – места контактов SRP с рибосомой, И1 и И2 – изгибы в структуре SRP, Г – вторичная структура 7SL РНК, Д – структура SRP в составе комплекса с рибосомой, Е – контакт К1 между SRP и рибосомой, Ж – контакты К2 и К3, З – К4, И – К5, К – К6, Л – конформационные изменения в структуре комплекса белка SRP54 со спиралью h8 в свободном состоянии и в составе комплекса с рибосомой.

и рибосомным белком L12 (рис. 5, И). Второй контакт образован гетеродимером SRP9/SRP14 с малой субъединицей рибосомы, точнее со спиралями h5 и h15 18S рРНК (рис. 5, К).

Область взаимодействия S-домена SRP с рибосомой частично перекрывается с областью контактов рибосомы с белковым комплексом Sec61: в обоих случаях оказываются задействованными рибосомные белки L25 и L35, спирали H59 и H24 25S рРНК [60]. Это является подтверждением предположения, что SRP и комплекс Sec61 не могут одновременно взаимодействовать с рибосомой. Полученная структура позволила сравнить структуру комплекса белка SRP54 со спиралью h8 в свободном состоянии и в составе комплекса с рибосомой (рис. 5, Л). Как оказалось, белок SRP54 претерпевает значительные структурные изменения. При образовании комплекса SRP с рибосомой происходит поворот NG-домена белка SRP54 относительно M-домена. При связывании сигнального пептида M-домен белка SRP54 также претерпевает структурные перестройки [59, 61].

#### БИОГЕНЕЗ SRP

Процесс сборки SRP в клетке был изучен с использованием нескольких подходов. Полноразмерную 7SL РНК, а также 7SL РНК, не содержащую спираль h6 или h8 (7SLΔ6 и 7SLΔ8 соответственно), отдельно Alu- и S-домены 7SL РНК вводили в ядра клеток животных и по флуоресцентной метке, находящейся в РНК, следили за ее перемещением [62]. Полноразмерная 7SL РНК сначала попадала в ядрышко, а затем транспортировалась в цитоплазму. 7SLΔ6 и Alu-домен РНК вели себя так же. 7SLΔ8 и S-домен с течением времени не изменяли своей локализации и оставались распределенными по ядру. Скорее всего, процессинг 7SL РНК и сборка SRP проходят в ядре. Локализация полноразмерной 7SL РНК в ядрышке могла бы свидетельствовать об общем месте сборки SRP и пре-рибосом. Однако оказалось, что SRP РНК локализована преимущественно в том районе ядрышка, где нет рибосомных РНК [63].

Создание химерных белков SRP19-GFP, SRP54-GFP, SRP68-GFP и SRP72-GFP, которые содержат зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein, GFP), позволило определить локализацию этих компонентов SRP в клетке. Как оказалось, SRP19, SRP68 и SRP72 находятся в ядрышке и в цитоплазме. Белок SRP54 детектировали только в цитоплазме. Из полученных данных следует, что сборка SRP или пре-SRP протекает в ядрышке [64], однако детальный механизм этого процесса пока неизвестен.

## СТРУКТУРА SR

В составе  $\alpha$ -субъединицы SR ( $SR\alpha$ ) можно выделить два домена: N-концевой глобулярный X-домен и C-концевой NG-домен. Несмотря на то, что  $SR\alpha$  является мембранным рецептором SRP, белок  $SR\alpha$  не содержит трансмембранных доменов в своей структуре.  $SR\alpha$  ведет себя как периферический мембранный белок, взаимодействие которого с мембраной разрушается в растворе с высокой ионной силой.  $SR\alpha$  локализован на поверхности мембраны за счет взаимодействия с  $SR\beta$ . За образование комплекса с  $SR\beta$  отвечает N-концевой X-домен  $SR\alpha$ , точнее первые 140 аминокислотных остатков [65]. NG-домен белка  $SR\alpha$  имеет значительное сходство с NG-доменом SRP54. Следует заметить, что NG-домены белков SRP54 и  $SR\alpha$  имеют между собой больше сходства, чем с другими белками, обладающими GTPазной активностью, и образуют подгруппу SRP GTPаз [66, 67].

Белок  $SR\beta$  содержит трансмембранный сегмент (TMC) на N-конце. В C-концевой части белка находится GTP-связывающий домен, локализованный на мембране с цитоплазматической стороны, причем по структуре он несколько отличается от SRP GTPаз и имеет большее сходство с подгруппой Ras GTPаз [68, 69].  $SR\beta$  взаимодействует с  $SR\alpha$  через свой GTP-связывающий домен [70].

В марте 2006 года была опубликована кристаллическая структура с разрешением 2,4 Å комплекса, образованного GTP-связывающим доменом белка  $SR\beta$  (аминокислотные остатки 58–269) мыши и X-доменом белка  $SR\alpha$  человека (аминокислотные остатки 1–176; X-домен составляют остатки 1–130) (рис. 6, А).  $SR\beta$  был связан с GTP. GTP-связывающий домен белка  $SR\beta$  содержит смешанный  $\alpha$ - $\beta$  мотив  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\alpha 3-\beta 5-\alpha 4-\beta 6-\alpha 5$ . В пространстве этот мотив располагается таким образом, что в центре находится шеститяжевой  $\beta$ -лист, окруженный пятью  $\alpha$ -спиралями. Такой способ укладки характерен для GTPаз Ras-семейства. GTP-связывающий домен белка  $SR\beta$  по вторичной структуре наиболее похож на белок Arf1, который принимает участие в везикулярном транспорте [71].

Следует отметить, что в основе структуры каждой GTPазы находится GTP-связывающий домен, состоящий из шеститяжевого  $\beta$ -листа, окруженного  $\alpha$ -спиралями. Пять полипептидных петель, которые образуют участок связывания GTP, являются наиболее консервативными участками этого домена и определяют принадлежность белка к GTPазам. Эти пять петель названы G-1, G-2, G-3, G-4 и G-5 соответственно:

– петля G-1 (мотив I, P-петля) имеет консенсусную последовательность (G/A)XXXXGK(S/T), где X – произвольная аминокислота

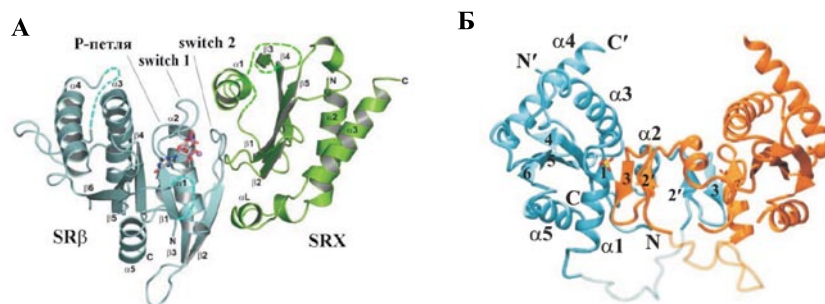


Рис. 6. Кристаллические структуры компонентов SR из клеток животных.

А – кристаллическая структура комплекса GTP-связывающего домена белка SRβ мыши с X-доменом белка SRα человека [71], Б – кристаллическая структура гомодимера SRβ(-TMC) [73].

(остатки 10–17 в GTPазе Ras), и соединяет цепь β1 со спиралью α1, а также контактирует с α- и β-фосфатами GTP или GDP;

– петля G-2 (мотив II, «switch 1») находится между спиралью α1 и цепью β2 (остатки 32–40 в GTPазе Ras). При связывании GTP происходит изменение конформации этой петли, в частности, происходит изменение ориентации важного консервативного остатка треонина (аминокислота 35 в GTPазе Ras). В кристаллах GTPазы Ras, связанных с негидролизруемым аналогом GTP, GMPPNP, содержится ион  $Mg^{2+}$ , который взаимодействует с β- и γ-фосфатами GTP и с гидроксилами боковых цепей треонина Thr35 и серина Ser17 из петли G-1. Этот ион магния важен для связывания GTP;

– консенсусная последовательность петли G-3 (мотив III, «switch 2») DXXG соответствует остаткам 53–62 GTPазы Ras. Эта петля связывает каталитически важный атом магния через молекулу воды и образует водородную связь с γ-фосфатом GTP;

– характерная аминокислотная последовательность петли G-4 состоит из четырех гидрофобных или неполярных аминокислот, за которыми следует последовательность (N/T)(K/Q)XD. В GTPазе Ras это соответствует гидрофобной β-цепи и гидрофильной петле. Карбоксильная группа Asp119 (GTPаза Ras) образует водородные связи с группами гуанина, а протоны амидных групп Asn116 и Lys117 стабилизируют участок связывания нуклеотида посредством образования водородных связей с остатками 13 и 14 петли G-1;

– петля G-5 (аминокислотные остатки 144–146 GTPазы Ras), находится между цепью β6 и спиралью α5 и не имеет консенсусной последовательности. Взаимодействие петли G-5 с GTP осуществляется в основном опосредованно, путем стабилизации за счет водород-



ных связей остатков Asn116 и Asp119 в петле G-4. Эта петля имеет только один непосредственный контакт с GTP через амидную группу Ala146 [72].

X-домен белка SR $\alpha$  содержит мотив  $\beta 1-\beta 2-\alpha 1-\beta 3-\beta 4-\beta 5-\alpha 3-\alpha 4$ . В пространстве  $\beta$ -цепи укладываются в пятикратной антипараллельный  $\beta$ -лист, с вогнутой (внутренней) стороны находится спираль  $\alpha 1$ , а с другой стороны – C-концевые спирали  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ .

В образовании комплекса со стороны GTP-связывающего домена белка SR $\beta$  принимают участие P-петля (аминокислотные остатки 69–76), петля «switch 1» (аминокислотные остатки 84–97, между спиралью  $\alpha 1$  и тяжом  $\beta 2$ ), петля «switch 2» (аминокислотные остатки 116–129, расположенные между  $\beta 3$  и  $\alpha 2$ ), а также аминокислотные остатки из цепи  $\beta 2$  (аминокислотные остатки 98–115). Со стороны X-домена белка SR $\alpha$  во взаимодействие с GTP-связывающим доменом вовлечены спираль  $\alpha 1$ , петля между тяжами  $\beta 1$  и  $\beta 2$ , и петля между спиралями  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ , содержащая также короткий участок со структурой  $\alpha$ -спирали, так называемая  $\alpha L$ .

X-домен белка SR $\alpha$  занимает на поверхности SR $\beta$  участок, который представляет собой типичный участок связывания GAP-белков (GAP-белки активируют гидролиз GTP). Это взаимодействие стабилизирует положение в пространстве петли «switch 2» таким образом, что каталитически важный остаток His119 находится вне участка связывания GTP, за счет чего GTP-связывающий домен белка SR $\beta$  образует стабильный комплекс с GTP [71].

Также недавно была получена кристаллическая структура дрожжевого SR $\beta$ (-TMC) с разрешением 2,2 Å в нуклеотид-несвязанном состоянии [73]. Оказалось, что SR $\beta$ (-TMC) способен образовывать гомодимер (рис. 6, Б). По сравнению со структурой в комплексе с SR $\alpha$ , в структуре гомодимера GTP-связывающий участок SR $\beta$  организован совсем иначе. Петля «switch 1» (аминокислотные остатки 61–72) имеет подвижную конформацию и ее не удается детектировать. Тяжи  $\beta 2$  и  $\beta 3$  (аминокислотные остатки 73–87) и петля «switch 2» (аминокислотные остатки 88–101) оказываются выпетленными и образуют контакты со второй молекулой SR $\beta$ (-TMC). Цепь  $\beta 3$  образует антипараллельный  $\beta$ -лист с цепью  $\beta 1$  второй молекулы SR $\beta$ (-TMC), в то время как в комплексе с SR $\alpha$  образовывался параллельный  $\beta$ -лист. Кроме того, первый поворот в спирали  $\alpha 2$  трансформируется в тяж  $\beta 2'$ , который заменяет цепь  $\beta 2$  в формировании  $\beta$ -листа с тяжом  $\beta 3$ . Консервативный остаток Pro89 в данной структуре присутствует в виде цис-изомера, тогда как в комплексе с SR $\alpha$  он находился в транс-конформации. Подобная структура для GTPаз наблюдалась впервые [73].

## СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА РИБСОМА/СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД/SRP/SR

Совсем недавно с помощью криоэлектронной микроскопии была определена структура комплекса рибосома/сигнальный пептид/SRP/SR с разрешением 7,4 Å (рис. 7, А–В) [74]. Вместо полноразмерного SR был использован так называемый растворимый рецептор, комплекс SR $\alpha$  с SR $\beta$ (-TMC) (SR $\beta$  не содержал N-концевого трансмембранного сегмента). Было обнаружено, что присутствие SR не меняет характер взаимодействия Alu-домена SRP с рибосомой. Однако во взаимодействии S- домена SRP с рибосомой наблюдаются значительные изменения. S-домен немного поворачивается, но контакты K2, K3 и K4 сохраняются. Полностью нарушается контакт N-домена белка SRP54 с рибосомными белками L23e и L35 (контакт K1). Как известно, эти рибосомные белки также вовлечены во взаимодействие с транслоконом, белковым комплексом Sec61 [63]. Вполне возможно, что SR, нарушая этот контакт между SRP и рибосомой, делает возможным начальное взаимодействие рибосомы с транслоконом. К сожалению, авторам не удалось обнаружить в полученной структуре NG-доменов белков SRP54 и SR $\alpha$ . Возможно, взаимодействие между этими доменами приводит к их делокализации и разрушению контакта K1 (рис. 7, Г).

Были также обнаружена электронная плотность, в которую довольно хорошо вписывалась структура комплекса GTP-связывающего домена SR $\beta$  с X-доменом SR $\alpha$ . Как оказалось, SR, помимо образования комплекса между NG-доменами белков SRP54 и SR $\alpha$ , образует дополнительные контакты с SRP и рибосомой (рис. 7, Д, Е). Наблюдали взаимодействие SR $\beta$  с 7SL РНК, рибосомным белком L31 и спиралью H99 25S рРНК. Эти данные согласуются с обнаруженной ранее сшивкой между SR $\beta$  и белком большой рибосомной субъединицы массой 21 кДа. Такое положение GTP-связывающего домена SR $\beta$  на рибосоме не противоречит нахождению его трансмембранного сегмента в мембране. X-домен белка SR $\alpha$  образует контакт только с SRP: с 7SL РНК и с гетеродимером SRP68/SRP72 [74].

## ФУНКЦИЯ SRP И SR: РАННИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функция SRP и ее состав были определены сравнительно давно. В 1980 г. Г. Блобель с сотрудниками опубликовал работу, в которой были описаны выделение и характеристика неизвестного белкового комплекса, названного сигналузнающий белок (signal recognition protein, SRP) [1]. До этой работы было известно, что микросомальные мембраны способны транслоцировать растущий пре-секреторный пептид через липидный бислой. Если обработать

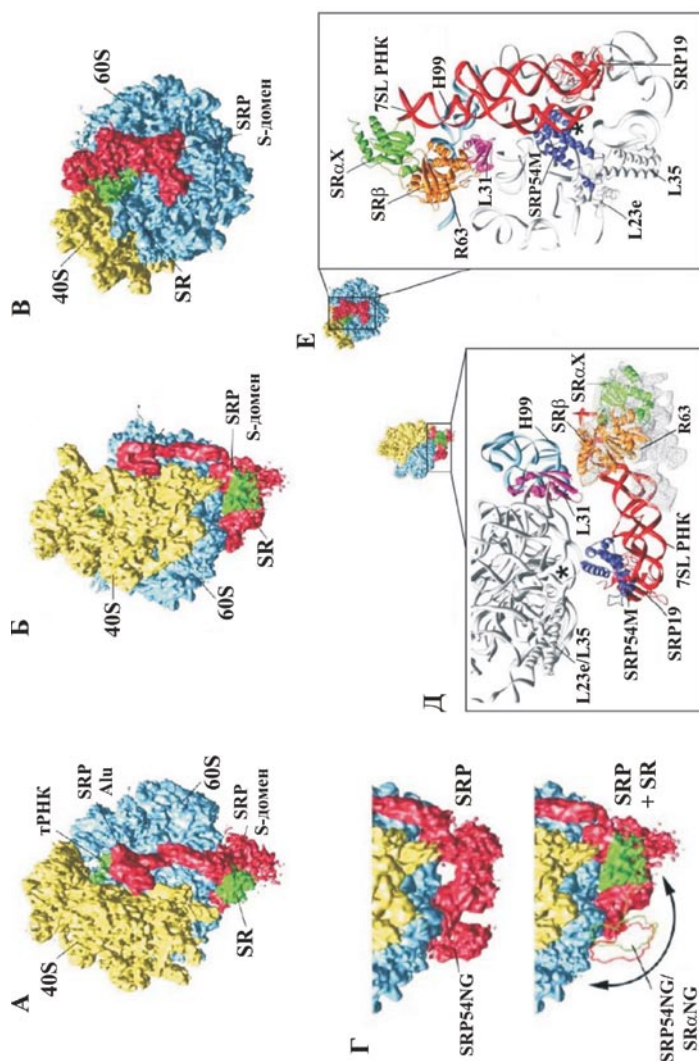


Рис. 7. Структура комплекса рибосома/сигнальный пептид/SRP/SR, определенная с помощью криоэлектронной микроскопии [74].

А, Б и В – структура комплекса рибосома/SRP/SR в разных проекциях, Г – положение NG-домена SRP54 в комплексе рибосома/SRP (верхняя часть рисунка) и предполагаемое положение NG-доменов белков SRP54 и SR $\alpha$  в комплексе рибосома/SRP/SR (нижняя часть рисунка), Д, Е – участки взаимодействия SR с рибосомой и SRP.

микросомальные мембраны буферным раствором с высокой ионной силой, то микросомальные мембраны теряли способность к транслокации. Сочетая различные виды хроматографического разделения белков, которые диссоциируют с мембраны при обработке буферным раствором с высокой ионной силой, удалось выделить белковый компонент, добавление которого к неактивным мембранам восстанавливало транслокацию растущего пре-секреторного пептида через липидный бислой. Белковый компонент представлял собой прочный комплекс с коэффициентом седиментации 11S, состоящий из шести белков с молекулярными массами 72 кДа, 68 кДа, 54 кДа, 19 кДа, 14 кДа и 9 кДа.

Достаточно быстро были установлены основные этапы работы SRP' [1, 75–77]. На тот момент уже существовала *in vitro* система трансляции белков из ростков пшеницы (wheat germ system, WGS). Если проводить трансляцию секреторного белка препролактина в системе WGS в присутствии SRP', то SRP' был способен специфически связываться с сигнальным пептидом секреторного белка и с транслирующей его рибосомой. В контрольном эксперименте SRP' не взаимодействовал с рибосомой, транслирующей цитоплазматический белок глобин. Взаимодействие SRP' с рибосомой, транслирующей секреторный белок, сопровождалось ингибированием трансляции (это явление получило название «арест трансляции»). Длина пептида, синтезированного рибосомой до ареста трансляции, составляла около 70 аминокислотных остатков. Это означает, что SRP' способен вызывать остановку трансляции только после появления сигнального пептида из рибосомного туннеля. Добавление микросомальных мембран к комплексу транслирующая рибосома/SRP' приводило, во-первых, к связыванию рибосомы и SRP' с мембраной (транслирующая секреторный белок рибосома не связывается с мембраной в отсутствие SRP'), во-вторых, к снятию ареста трансляции (происходило накопление процессированного пролактина). Появление именно процессированной формы белка пролактина (при этом от препролактина отрезается сигнальный пептид) свидетельствовало о том, что препролактин прошел через липидный бислой и находится внутри микросомальной везикулы. Также было высказано предположение о существовании мембранного рецептора для SRP'. Собственно, эти эксперименты являлись основополагающими в исследовании SRP-зависимого транспорта белков. Предложенная на основе этих данных модель котрансляционного транспорта белков с участием SRP' оказалась правильной и получила в дальнейшем полное подтверждение.

Вскоре был найден еще один компонент SRP – 7SL РНК, которая необходима для функционирования SRP. Сигналузнающий белок был переименован в сигналузнающую частицу, с этого момента SRP стали расшифровывать как signal recognition particle [2].

Предположение о существовании гипотетического мембранного SRP рецептора было подтверждено экспериментально. Частичный протеолиз микросомальных мембран приводил к элюции с мембраны белка массой 60 кДа, который вместе с SRP восстанавливал транслоцирующую функцию инактивированных протеазой мембран. Выделенный белок массой 60 кДа оказался фрагментом периферического мембранного белка массой 72 кДа, который был назван SR. Основная функция SR заключалась во взаимодействии с SRP, что приводило к присоединению комплекса транслирующая рибосома/SRP к мембране, и к снятию ареста трансляции [78, 79]. Также было показано, что процессинг секреторных белков при их попадании в/через мембрану ER, точнее специфическое отрезание сигнальной последовательности, осуществляет не SR, а другой белок [80]. Позже было выяснено, что SR состоит из двух белков. Помимо белка с массой 72 кДа ( $\alpha$ -субъединица SR) был найден мембранный белок с массой 30 кДа ( $\beta$ -субъединица SR). Оба белка образуют между собой прочный комплекс [81].

Ассоциация SRP с микросомальными мембранами свидетельствовала о том, что SRP локализована в клетке на поверхности ER. Но взаимодействие SRP с транслирующей рибосомой предполагало, что SRP может осуществлять это в цитоплазме. Действительно, SRP может быть выделена из цитоплазмы, причем она обладает всеми функциями, которые присущи локализованной на мембране SRP [78]. В целом, в клетке 47% от общего количества SRP содержится в рибосомной фракции, 38% – в мембранной фракции, 15% SRP не связано ни с рибосомами, ни с мембраной [82].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: СИГНАЛЬНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Насколько универсален котрансляционный транспорт с участием SRP? В разработанной Г. Блобелем с сотрудниками сопряженной системе трансляции–транслокации был изучен транспорт нескольких мембранных белков:  $\delta$  субчастицы ацетилхолинового рецептора и цитохрома P-450, гликопротеина B1 вируса Sindbis, растительных белков легумина А и Б и др. Оказалось, что все исследованные белки направлялись в/через мембрану котрансляционно и в присутствии SRP [83–87]. Из этих опытов были сделаны выводы, во-первых, о том, что SRP – это универсальный путь транспорта белков в/через

мембрану ER, во-вторых, что сигнальные последовательности на N-конце растущего пептида, несмотря на различия в первичной структуре, работают одинаково. Еще одно подтверждение этих выводов представляет работа, где в сопряженной системе трансляции–транслокации проводили трансляцию бактериального секреторного белка  $\beta$ -лактамазы. Прохождение  $\beta$ -лактамазы через мембрану также проходило котрансляционно и с участием SRP [88]. Также было показано, что ооциты шпорцевой лягушки способны секретировать  $\beta$ -лактамазу [88].

Дальнейшее изучение N-концевых сигнальных последовательностей выявило некоторые общие закономерности в их строении. Сигнальная последовательность состоит из 20–30 аминокислотных остатков, среди которых можно выделить три района: короткий, положительно заряженный N-концевой район, центральный гидрофобный участок и C-концевой район, содержащий более полярные аминокислотные остатки. Иногда в C-концевой части сигнальной последовательности находится специфический участок узнавания для пептидазы, которая отрезает сигнальный пептид. Несмотря на то, что в первичной структуре сигнальных пептидов почти нет гомологии, все они обладают схожими физико-химическими свойствами. Во-первых, гидрофобность центральной части не должна быть ниже определенного уровня. Встраивание одного заряженного аминокислотного остатка в гидрофобную часть сигнальной последовательности приводит к тому, что пептид теряет способность транспортироваться по SRP-зависимому механизму. Во-вторых, вторичная структура должна представлять собой  $\alpha$ -спираль, поскольку было показано, что введение в сигнальный пептид аминокислотных остатков, которые разрушают конформацию  $\alpha$ -спирали, также нарушает способность мутированных сигнальных последовательностей взаимодействовать с SRP [66].

Через некоторое время были обнаружены мембранные белки, интеграция которых в мембрану происходит без SRP. Например, цитохром b5 попадает в мембрану без участия SRP [87]. Следовательно, SRP-зависимый транспорт белков – не единственно возможный путь транслокации белков в/через мембрану ER. Более того, в разных системах один и тот же белок может транспортироваться в мембрану по SRP-зависимому или по SRP-независимому пути транспорта. Было показано, что препро- $\alpha$ -фактор, предшественник дрожжевого феромона  $\alpha$ -фактора, транспортируется в дрожжевые микросомальные мембраны посттрансляционно, тогда как его транспорт в микросомальные мембраны из клеток животных проходит котрансляционно с участием SRP и SR [89].

ФУНКЦИЯ SRP И SR: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ  
МЕЖДУ ДОМЕНАМИ SRP

После определения всех компонентов SRP, встал вопрос о том, какие компоненты SRP за какую функцию отвечают. Было показано, что SRP функционирует как единая частица, и в ее работе принимают участие как белковые компоненты, так и 7SL РНК. Обработка SRP нуклеазой приводила к потере функции частицы [2, 90]. Инактивация белков с помощью N-этилмалеимида (модифицирует –SH группу белков) или с помощью антител также приводила к нарушению функционирования SRP [2, 14, 75, 82]. Присутствие в реакционной смеси антител к белкам SRP68 и SRP72 блокировало работу SRP на ранних этапах; антитела к белку SRP54 в аналогичной ситуации сохраняли способность SRP вызывать арест трансляции, но нарушали взаимодействие SRP с микросомальными мембранами [82].

Конструирование мутантных SRP, которые не содержали какого-либо белка или белков, позволило выявить роль этих белков. SRP без гетеродимера SRP9/SRP14 (SRP(-9/14)) была вполне стабильна и сохраняла способность связываться с сигнальным пептидом с такой же аффинностью, что и полноценная SRP, однако, не вызывала ареста трансляции. Вместо короткого пептида, синтез которого останавливался при наличии SRP, в отсутствие микросомальных мембран накапливался непротессированный полноразмерный препролактин приблизительно так же, как это происходит в системе трансляции из проростков пшеницы (WGS) без SRP. SRP(-9/14) также сохраняла способность к взаимодействию с SR и транслокации растущего пептида в микросомальную мембрану, хотя это протекало с меньшей эффективностью, чем в случае полноценной SRP [91]. Добавление гетеродимера SRP9/SRP14 к SRP(-9/14) восстанавливало способность SRP вызывать арест трансляции [23]. Более детальное изучение роли Alu-домена SRP в работе SRP показало, что даже удаление двадцати C-концевых аминокислотных остатков в белке SRP14 делает арест трансляции невозможным [92]. Известно, что в клетках человека находится довольно большое количество Alu-РНК. Как уже упоминалось, ее функция пока неизвестна. Поскольку гетеродимер SRP9/SRP14 взаимодействует с Alu-доменом 7SL РНК, то возникло предположение, что SRP9/SRP14 способен образовывать комплекс с Alu-РНК. Это предположение было подтверждено экспериментально. *In vitro* гетеродимер образует комплексы с разными Alu-РНК с высокой константой. Более того, было обнаружено, что количество гетеродимера SRP9/SRP14 в клетках человека почти в 20 раз больше, чем количество SRP. Полученные данные позволяют сделать вывод, что

гетеродимер SRP9/SRP14, скорее всего, образует комплексы с Alu-РНК в клетке и имеет дополнительную неизвестную функцию [93–95].

Эксперименты по диссоциации SRP на отдельные компоненты также позволили выявить функцию компонентов SRP. Известно, что N-этилмалеимид способен нарушать функцию белков без значительных структурных повреждений. Функцию отдельных белковых компонентов SRP изучали, проводя сборку SRP после обработки одного из белков N-этилмалеимидом [96]. Инактивация гетеродимера SRP68/SRP72 приводила к тому, что SRP сохраняла способность вызывать арест трансляции, но нарушалось взаимодействие SRP с рецептором. Модификация белка SRP54 приводила к тому, что SRP теряла способность связывать сигнальный пептид [96]. Позднее было показано, что сигнальный пептид взаимодействует только с белком SRP54 независимо от других компонентов SRP [97]. В составе белка SRP54 за связывание с сигнальным пептидом отвечает, скорее всего, M-домен [47, 50, 52, 97]. Мутантная SRP, содержащая M-домен белка SRP54 вместо полноразмерного белка SRP54, сшивается с сигнальным пептидом чуть хуже, чем нормальная SRP [48]. Свободный M-домен белка SRP54 тоже дает сшивку с сигнальным пептидом, но выход продукта сшивания ниже, чем в случае полноразмерного белка SRP54. Поэтому нельзя исключать возможность того, что SRP54NG тоже может принимать участие в связывании сигнального пептида [47, 48].

Таким образом, Alu-домен SRP отвечает за арест трансляции, а S-домен SRP – за узнавание сигнального пептида и за взаимодействие с рецептором.

Следует отметить, что SRP высших эукариот консервативна. Ее компоненты из разных организмов имеют сходную структуру. Например, всего 3 аминокислотные замены на 504 аминокислотных остатка отличают белок SRP54 мыши и собаки [98]. 7S РНК, выделенная из клеток *Drosophila melanogaster*, образует комплекс с белковыми компонентами SRP собаки, при этом полученная гетерологичная SRP вполне функциональна [14]. Более того, антитела к разным белковым компонентам SRP демонстрируют хорошую кросс-реакцию на гомологичные белки из других организмов [82].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: АРЕСТ ТРАНСЛЯЦИИ

Что такое арест трансляции? Следует заметить, что в своих первых работах, когда был обнаружен арест трансляции и детектирован пептид, синтез которого остановился, сам Г. Блобель интерпретировал полученные данные с осторожностью [77]. Вполне возможно, что арест не является скоростью-лимитирующей стадией, он может не быть



отдельной стадией при работе SRP, поскольку концентрация мембран ER в клетке много больше, чем в сопряженной *in vitro* системе трансляции–транслокации. Вскоре был обнаружен интересный факт. Остановка трансляции в ретикулоцитном лизате кролика и лизате клеток HeLa не происходила, т.е. не удавалось детектировать пептид, синтез которого остановился. SRP не осуществляла арест трансляции; без микросомальных мембран получался полноразмерный белок и присутствие SRP ничего не меняло [99]. Возникло предположение, что в этих системах либо нет ареста (арест – свойство WGS), либо этот арест выражается только в замедлении трансляции. Второе предположение получило экспериментальное подтверждение. Как оказалось, в разработанной Г. Блобелем системе другой секреторный белок, препромелиттин, в присутствии SRP претерпевает не строгий, а так называемый «проходимый» арест трансляции (в английском варианте «transient arrest»). Влияние SRP на синтез полноразмерного препромелиттина выражается только в снижении скорости трансляции. Данный «проходимый» арест специфический, зависит от концентрации SRP. В той же системе синтез предшественника легкой цепи иммуноглобулина в присутствии SRP дает строгий арест трансляции, в присутствии SRP не образуется полноразмерного белка [100]. Известны и другие доказательства того, что в некоторых случаях арест представляет собой обратимое ингибирование трансляции секреторных белков SRP. В разработанной Г. Блобелем системе протекает синтез полноразмерных предшественников, а присутствие SRP приводит к тому, что полноразмерный белок появляется позднее, чем без SRP [101, 102].

Вскоре Г. Блобелем с сотрудниками с использованием метода тупринта была разработана методика, которая позволяла детектировать остановки рибосомы на мРНК во время трансляции. Как оказалось, рибосома при прохождении мРНК в некоторых местах делает остановки, и присутствие SRP вызывает дополнительные остановки рибосомы [103, 104].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: ДЛИНА РАСТУЩЕГО ПЕПТИДА

Зависит ли эффективность взаимодействия SRP с сигнальной последовательностью от того, как далеко она ушла от рибосомы, от длины растущего пептида? По-видимому, да. Эффективность взаимодействия SRP с работающей рибосомой изучали в зависимости от времени синтеза секреторируемого белка. В течение некоторого времени проводили инициацию трансляции *in vitro*, затем ингибировали дальнейшие акты инициации трансляции и проводили элонгацию, получая, таким образом, синхронизированные транслирующие

рибосомы. Через определенные промежутки времени добавляли SRP и микросомальные мембраны и измеряли количество белка, прошедшего через липидный бислой. При трансляции легкой цепи IgG (ее длина составляет 230 аминокислотных остатков), если рибосома синтезировала 28% длины белка, то добавление SRP приводит к 100% аресту трансляции и 100% транслокации; если рибосома синтезировала 50% длины белка, то добавление SRP также приводит к 100% аресту трансляции и 100% транслокации; если рибосома синтезировала 75% длины белка, то добавление SRP приводит к 50% аресту трансляции и 50% транслокации; если рибосома синтезировала 95% длины белка, то добавление SRP не приводит ни к аресту трансляции, ни к транслокации [105]. Если проводить трансляцию *in vitro* мРНК разной (возрастающей) длины без стоп-кодона, то все рибосомы будут останавливаться, синтезируя пептид определенной длины. Добавление к таким рибосомным комплексам SRP и микросомальных мембран, приводит к схожим результатам [106]. Эффективность взаимодействия SRP с растущим пептидом также изучали с помощью сшивания. Оказалось, что SRP пришивается к растущему препролактину с эффективностью, зависящей от длины синтезированной белковой цепи. Наибольший выход сшивки наблюдался на ранней стадии трансляции, а с увеличением длины растущего пептида выход сшивки падает [107].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: SRP – ШАПЕРОН

Известно, что некоторые цитозольные факторы с активностью шаперона, а именно белок TF (trigger factor, TF), способны поддерживать секреторные и мембранные белки в компетентном для транслокации состоянии. Очищенный белок proOmpA после инкубации при 0 °C в течение 15 часов полностью терял способность к транслокации. Если белок proOmpA инкубировали в тех же условиях в присутствии TF, то он сохранял способность транслоцироваться. Таким образом, TF может поддерживать белки в компетентном для транспорта состоянии. Поведение SRP в такой ситуации было аналогично поведению TF. Иными словами, помимо узнавания сигнального пептида и направления его к месту транспорта, SRP имеет дополнительную функцию поддержания сигнального пептида в состоянии, компетентном для транслокации [108].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ SRP И SR, ГИДРОЛИЗ GTP

Один из этапов работы SRP – взаимодействие с SR. В результате этого взаимодействия синтезирующая секреторный или мембранный белок рибосома оказывается связанной с мембраной. В ранних иссле-

дованиях были установлены некоторые основные характеристики этого взаимодействия. Во-первых, взаимодействие SR с SRP, приводящее к снятию ареста трансляции, не является замещением SRP на SR, поскольку SR не способен напрямую образовывать стабильный комплекс с транслирующей рибосомой [109]. Во-вторых, отсутствие прочного связывания между SR и рибосомой предполагает существование на мембране рецептора для рибосомы. Действительно, если обработать микросомальные мембраны протеазой, а потом провести встраивание SR, то такие мембраны не способны связывать рибосомы. Позднее было показано, что рибосома контактирует с транслоконом, представляющим собой комплекс мембранных белков Sec61 [20]. В-третьих, было исследовано, влияет ли трансляция пептида на взаимодействие SRP с SR. Оказалось, что комплекс транслирующая рибосома/SRP связывается с мембраной при 0 °С, когда нет трансляции, т.е. взаимодействие SRP с SR протекает независимо от элонгации пептидной цепи [109].

SR, взаимодействуя с SRP, разрушает контакт SRP с сигнальной последовательностью растущего пептида, причем для этого необходим GTP [110]. В присутствии негидролизованного аналога GTP (GMPPNP) SRP сохраняет способность образовывать комплекс с SR, но этот комплекс не диссоциирует, SRP остается связанной с мембраной и не может участвовать в последующих раундах транслокации [111]. С помощью анализа первичной структуры в составе белка SR $\alpha$  удалось найти GTP-связывающий домен, G-домен [110]. В первичной структуре белка SRP54 также был найден GTP-связывающий домен, причем между этими доменами наблюдалось значительное сходство [6, 112]. GTP-связывающий домен, а именно аминокислотные мотивы, характерные для всех GTP-связывающих белков, в белке SR $\alpha$  были мутированы, и была проведена функциональная проверка этих мутантов. Мутанты теряли частично или полностью способность образовывать комплекс с SRP в присутствии GMPPNP, и были неспособны осуществлять транслокацию [113]. Мутации в GTP-связывающем домене SRP54 давали тот же эффект [114]. Т.е. гидролиз GTP сопряжен с диссоциацией комплекса SRP/SR. Действительно, было показано, что GTP-связывающая и GTP-гидролизующая активности отдельных белков SRP54 и SR $\alpha$  очень низки. Образование комплекса SRP54/SR $\alpha$  сопровождалось значительным ускорением гидролиза GTP [115]. Таким образом, было показано, что помимо узнавания сигнального пептида, белок SRP54 выполняет еще одну функцию SRP – взаимодействие с SR.

Следует сказать, что в так называемой классической модели работы GTPазы можно выделить два состояния: активное (в комплексе с

GTP) и неактивное (в комплексе с GDP). Переход между этими двумя состояниями позволяет GTPазам изменять аффинность к другим макромолекулам. Переход между активным и неактивным состоянием сама GTPаза осуществляет крайне медленно; катализаторами этого перехода выступают белки, стимулирующие GTPазную активность (GTPase activating proteins, GAPs) или белки, катализирующие диссоциацию GDP (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) [67].

По мере накопления экспериментальных данных были предложены несколько моделей того, как осуществляется взаимодействие SRP с SR и как протекает гидролиз GTP комплексом SRP/SR [114–118]. Однако все предложенные модели имели по большей части умозрительный характер и не были подтверждены достоверными экспериментальными данными. Работа [119] изменила представления о согласованной работе SRP и SR и сопряженном с этим гидролизом GTP. В белке SR $\alpha$  была сделана мутация, которая меняла специфичность к нуклеотиду: SR $\alpha$  вместо GTP связывал XTP. Оказалось, что успешная транслокация растущего пептида в/через мембрану может проходить только в присутствии обоих нуклеотидов – GTP и XTP. Присутствие негидролизуемых аналогов GMPPNP и XMPPNP приводит к образованию стабильного комплекса SRP/SR. Следовательно, в клетке диссоциация комплекса SRP/SR требует синхронного гидролиза GTP белками SRP54 и SR $\alpha$ . В данном случае SRP54 и SR $\alpha$  служат GAP-белками друг для друга. Авторами была выдвинута модель, согласно которой SRP54 при взаимодействии SRP с сигнальным пептидом и рибосомой находится в свободном состоянии без нуклеотида. SR $\alpha$  также не связан с GTP. Образование комплекса транслирующая рибосома/SRP/SR вызывает кооперативное связывание двух молекул GTP и инициирует высвобождение сигнального пептида. Гидролиз GTP сопровождается диссоциацией комплекса SRP/SR. Эта модель на сегодняшний день является более предпочтительной [66].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМЫ И SR $\alpha$

Существует интересная особенность взаимодействия SRP и SR. В свободном состоянии они способны образовывать комплекс, который после гидролиза двух молекул GTP распадается. Но в клетке этого, скорее всего, не происходит. SR должен различать SRP в свободном состоянии и SRP в комплексе с транслирующей рибосомой. Вполне возможно, что при взаимодействии SRP с рибосомой изменяется конформация белка SRP54 таким образом, что его сродство к SR $\alpha$  увеличивается. В 2003 году была опубликована работа, в которой были представлены доказательства того, что SR $\alpha$

способен взаимодействовать с рибосомой. Оказалось, что не только транслирующие рибосомы, но и отдельно 60S рибосомная субъединица способны активировать гидролиз GTP белками SRP54 и SR $\alpha$ . Во взаимодействии с рибосомой участвует N-конец белка SR $\alpha$ . Авторы выдвигают предположение, что рибосома предоставляет платформу для образования комплекса SRP–SR. Прямой контакт между SR $\alpha$  и рибосомой ускоряет процесс присоединения рибосомы к мембране ER, а взаимодействие SRP с SR отвечает за точность SRP-зависимого транспорта белков [120].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: РОЛЬ SR $\beta$

Как уже отмечалось, SR $\beta$  представляет собой мембранный белок. Трансмембранный сегмент (ТМС) находится на N-конце белка, а цитоплазматическая часть белка содержит GTP-связывающий домен [68]. Анализ первичной структуры GTP-связывающего домена SR $\beta$  показал, что он имеет большее сходство с аминокислотными последовательностями GTPаз, подобных GTPазе Ras, чем с GTP-связывающими доменами белков SRP54 и SR $\alpha$ . По данным сшивания, SR $\beta$  связан с GTP и в отсутствие SRP [69]. Вначале было выдвинуто предположение, что основная функция SR $\beta$  заключается в локализации на мембране белка SR $\alpha$ . SR $\beta$  осуществляет взаимодействие с X-доменом SR $\alpha$  через свой GTP-связывающий домен, при этом SR $\beta$  должен находиться в GTP-связанной форме. Трансмембранный сегмент SR $\beta$  не принимает участие во взаимодействии с SR $\alpha$  [70]. Позднее выяснилось, что помимо локализации SR $\alpha$  на мембране, белок SR $\beta$  имеет дополнительные функции. Гетеродимер SR $\alpha$ /SR $\beta$ (-ТМС), так называемый водорастворимый рецептор SRP, проявляет 50% активность в транслокации пептида, в то время как без SR $\beta$  транслокации не наблюдалось вовсе [121].

Ранее было показано, что транслирующая рибосома взаимодействует с находящимся в мембране SR $\beta$  и стимулирует GTP-гидролитическую активность SR $\beta$  [69]. Рибосома для SR $\beta$  является GAP-белком. Позднее была детектирована сшивка белка SR $\beta$ (-ТМС) с рибосомным белком, сходящим в состав большой рибосомной субчастицы. Причем выход сшивки зависел от присутствия нуклеотидов: в свободном состоянии или в комплексе с GDP SR $\beta$ (-ТМС) давал сшивку, присутствие GTP или GMPPNP препятствовало образованию сшивки. Присутствие комплекса белков Sec61 приводило к исчезновению сшивки между рибосомой и SR $\beta$ . Также с помощью сшивки было показано, что при связывании GTP белком SR $\beta$  происходит высвобождение сигнального пептида из комплекса с SRP

[121]. Иными словами, SR $\beta$  находясь в свободном состоянии или в комплексе с GDP, взаимодействует с транслирующей рибосомой. Присутствие комплекса белков Sec61 разрушает взаимодействие SR $\beta$  с рибосомой, в результате чего SR $\beta$  связывает GTP и способствует отсоединению сигнального пептида от SRP [121, 122].

Недавно обнаруженная способность белка SR $\beta$  к образованию гомодимера в отсутствие GTP наводит на мысль, что данная структура отражает возможное состояние SR $\beta$  в клетке. Как оказалось, белок SR $\beta$  образует гомодимер не только в условиях кристаллизации, но и в растворе. В присутствии GTP или GDP происходило ингибирование димеризации. Образование гомодимера наблюдали также для SR $\beta$  из других организмов [74].

### III. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИЯ SRP И SR ИЗ КЛЕТОК *S. cerevisiae*

Применение методики выделения SRP, разработанной для клеток животных, к дрожжевым клеткам *Schizosaccharomyces pombe* и *Yarrowia lipolytica* позволило выделить рибонуклеопротеидные комплексы, которые по своим физико-химическим свойствам имели сходство с SRP из клеток животных. Коэффициент седиментации этих рибонуклеопротеидов составлял 11S, и они обладали повышенной аффинностью к DEAE-сефарозе [4]. Данные рибонуклеопротеиды содержали молекулу 7SL РНК, которая по вторичной структуре имела значительное сходство с 7SL РНК человека [4, 123]. Применение описанной методики к клеткам *S. cerevisiae* успеха не имело [4]. Секвенирование генов белков SRP54 человека и Ffh *E. coli* позволило П. Уолтеру разработать стратегию поиска генов белков, входящих в состав SRP, с использованием праймеров, гомологичным наиболее консервативным участкам кодирующей последовательности. С помощью этого подхода удалось найти ген белка Srp54p *S. cerevisiae* [98]. Белок Srp54p тоже имел значительную гомологию с белками SRP54 из других эукариотических организмов. С помощью антител к белку Srp54p из клеток *S. cerevisiae* удалось выделить рибонуклеопротеид с коэффициентом седиментации 16S [124]. Выделенная частица (SRP) содержала молекулу scR1 РНК и белки Srp14p (присутствует в виде гомодимера), Srp21p, Srp54p, Srp68p, Srp72p и Sec65p [7, 124]. В составе SRP из *S. cerevisiae* также можно выделить два домена: Alu-домен и S-домен. Alu-домен SRP образован, как предполагают, Alu-участком scR1 РНК и белками: гомодимером Srp14p и белком Srp21p. S-домен SRP содержит II, III и IV домены scR1 РНК и белки Srp54p, Srp68p, Srp72p и Sec65p (рис. 1, Г, Д.).

## СТРУКТУРА SCR1 РНК

Несмотря на то, что первичная структура scR1 РНК была определена сравнительно давно, детальное изучение вторичной структуры scR1 РНК было проделано в последние годы [125, 126]. На основе сравнения первичной структуры scR1 РНК со структурами SRP РНК других дрожжей и данных сайт-направленного мутагенеза была предложена вторичная структура scR1 (рис. 8). S-домен scR1 РНК имеет структуру, схожую со структурами S-домена SRP РНК из других эукариотических организмов. S-домен – наиболее консервативный участок в SRP РНК эукариот. Структура Alu-домена scR1 РНК имеет значительные отличия от структуры Alu-доменов высших эукариот, например человека, но имеет значительные сходства с Alu-доменами SRP РНК из других видов дрожжей. Alu-домен в дрожжах более протяженный, содержит множественные протяженные спаренные участки [126, 127]. Возможно, такая протяженная структура Alu-домена функционально необходима для дрожжей. Транскрипцию гена, кодирующего scR1 РНК, также осуществляет РНК-полимераза III [125].

СТРУКТУРА ALU-ДОМЕНА SRP *S. cerevisiae*

Белок Srp14p является гомологом белка SRP14 из клеток животных (сходство аминокислотной последовательности 30%) и находится в составе SRP в виде гомодимера [7, 8, 128]. Белок Srp21p, как было показано, присутствует не только в SRP *S. cerevisiae*, но и в других видах дрожжей [129]. Недавно была выявлена гомология между дрожжевым белком Srp21p и белком SRP9 как по первичной структуре, так и по предложенной для Srp21p вторичной структуре [129].

Было показано, что при связывании гомодимера белка Srp14p с scR1 РНК наблюдаются защиты от гидроксильных радикалов в 5'-концевой области scR1 РНК. Минимальный участок scR1 РНК, который способен образовывать комплекс с Srp14p, представляет собой первые 99 нуклеотидных остатков [128]. Для минимального связывающего участка scR1 РНК была предложена модель вторичной структуры, но в составе полноразмерной scR1 РНК этот участок имеет, скорее всего, другую структуру [126].

К сожалению, на сегодняшний день не известна структура комплекса гомодимера белка Srp14p с Alu-участком scR1 РНК и пространственная укладка многочисленных спиралей Alu-домена scR1 РНК. Неизвестны предполагаемые контакты белка Srp21p с белком Srp14p и/или scR1 РНК. Также неизвестен механизм сборки Alu-домена дрожжевой SRP.

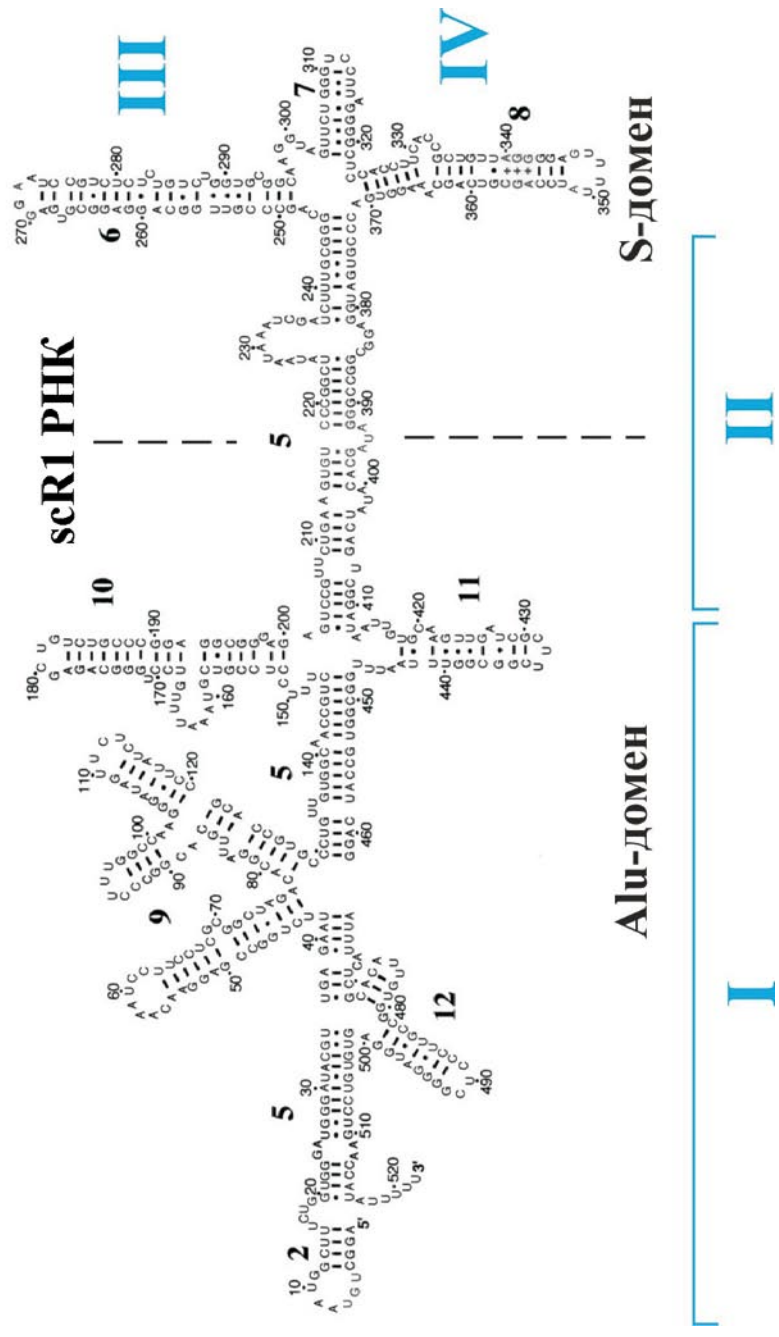


Рис. 8. Вторичная структура scR1 [127].



СТРУКТУРА S-ДОМЕНА SRP *S. cerevisiae*

Белок Srp68p дрожжей имеет сходство с белком SRP68 высших эукариот, 18% аминокислотных остатков идентичны. Белок Srp72p содержит 23% аминокислотных остатков, которые идентичны аминокислотным остаткам в белке SRP72 человека [7].

Было показано, что по первичной структуре белок Sec65p является гомологом белка SRP19 человека [130]. В составе белка Sec65p можно выделить три домена: N-концевой, центральный и C-концевой домены [131]. Причем аминокислотные остатки, гомологичные аминокислотным остаткам белка SRP19, находятся преимущественно в центральном домене [126].

Белок Srp54p дрожжей содержит 47% аминокислотных остатков, которые идентичны аминокислотным остаткам в белке SRP54 человека. В его структуре также можно выделить три домена: N-домен, G-домен и C-концевой M-домен, который также содержит много остатков метионина. G-домен содержит аминокислотные мотивы, характерные для GTP-связывающих белков [98, 126].

К сожалению, до сих пор не установлено, каким образом осуществляется взаимодействие как между белками Srp54p и Sec65p, так и этих белков с scR1 РНК. Нахождение белков Srp54p и Sec65p в S-домене SRP приводит, возможно, к непосредственному контакту между ними или белок Sec65p, по аналогии с белком SRP19, поддерживает структуру S-домена scR1 РНК в компетентном для связывания белка Srp54p состоянии.

## БИОГЕНЕЗ SRP

Благодаря тому, что в дрожжах можно довольно легко проводить различные генетические манипуляции, например, делеции различных генов, экспрессию в клетках генов, кодирующих белки с аффинными эпитопами, был довольно подробно изучен процесс сборки SRP в клетке. Как оказалось, белки Srp14p, Srp21p, Srp68p и Srp72p (так называемые коровые белки) находятся в клетке не только в цитоплазме, но и ядре. В транспорте этих белков в ядро принимают участие белки Kap123p и Pse1p (рис. 9). Белок Sec65p также присутствует в ядре, транспорт в ядро зависит от белка Srp1p и некоторых белков семейства импортинов. В нормальных условиях scR1 РНК в ядре детектировать не удалось, однако ее накопление в ядре происходит при делеции гена любого из коровых белков. После синтеза и процессинга scR1 РНК связывается с коровыми белками и с белком Sec65p, после чего происходит экспорт так называемой пре-SRP из ядра. Экспорт из ядра протекает при участии белков Xpo1p,

Nsp1p, Nup159p и Rrp44p. В цитоплазме к пре-SRP присоединяется последний компонент – белок Srp54p [132].

Транспорт коровых белков и белка Sec65p в ядро осуществляется независимо. Отсутствие в клетке одного из перечисленных белков не влияет на локализацию других. При отсутствии scR1 РНК коровые белки и белок Sec65p также присутствуют в ядре и в цитоплазме. На локализацию Srp54p не влияет делеция гена любого другого компонента SRP. Белок Srp54p всегда остается в цитоплазме [132, 133].

#### СТРУКТУРА SR *S. cerevisiae*

SR $\alpha$  дрожжей содержит 44% аминокислотных остатков, идентичных SR $\alpha$  высших эукариот. Как и в случае SR $\alpha$  из клеток животных, SR $\alpha$  *S. cerevisiae* представляет собой периферический мембранный белок [134].

Белок SR $\beta$ , как и белок SR $\beta$  высших эукариот, встроен в мембрану и также образует прочный комплекс с белком SR $\alpha$ . Также было показано, что GTP-связывающий домен белка SR $\beta$  участвует в образовании комплекса с SR $\alpha$ , поскольку мутации в этом домене сопровождались разрушением комплекса [135].

В работе [136] была представлена кристаллическая структура комплекса GTP-связывающего домена SR $\beta$  (аминокислотные остатки

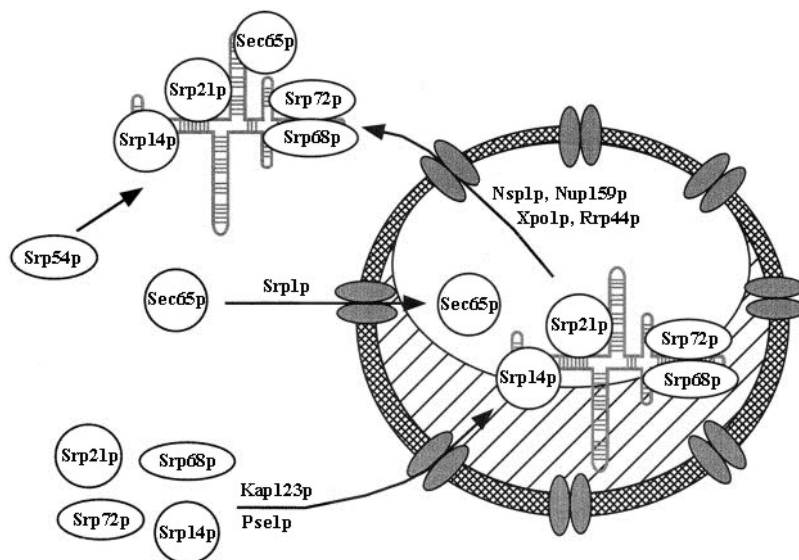


Рис. 9. Схема сборки SRP [132].

31–244) с X-доменом белка SR $\alpha$  (аминокислотные остатки 1–158), определенная с разрешением 1,7 Å. GTP-связывающий домен белка SR $\beta$  *S. cerevisiae* содержит такой же структурный  $\alpha$ - $\beta$  мотив  $\beta$ 1- $\alpha$ 1- $\beta$ 2- $\beta$ 3- $\alpha$ 2- $\beta$ 4- $\alpha$ 3- $\beta$ 5- $\alpha$ 4- $\beta$ 6- $\alpha$ 5, что и белок SR $\beta$  мыши. В пространстве этот мотив располагается аналогичным образом: в центре находится шеститяжевой  $\beta$ -лист, окруженный пятью  $\alpha$ -спиралями. X-домен белка SR $\alpha$  из *S. cerevisiae* также содержит мотив  $\beta$ 1- $\beta$ 2- $\alpha$ 1- $\beta$ 3- $\beta$ 4- $\beta$ 5- $\alpha$ 3- $\alpha$ 4, пространственная структура которого организована аналогично структуре X-домена SR $\alpha$  человека:  $\beta$ -тяжи образуют пятитяжевой антипараллельный  $\beta$ -лист, с вогнутой (внутренней) стороны находится  $\alpha$ 1 спираль, а с другой стороны – C-концевые  $\alpha$ 2 и  $\alpha$ 3 спирали.

В структуре можно наблюдать многочисленные контакты между GTP-связывающим доменом SR $\beta$  и X-доменом SR $\alpha$ . Петля «switch 1» (аминокислотные остатки 61–72, между  $\alpha$ 1 и  $\beta$ 2) белка SR $\beta$  образует контакты со спиралью  $\alpha$ 1 и петлей между тяжами  $\beta$ 1 и  $\beta$ 2 (аминокислотные остатки 10–14) белка SR $\alpha$ . В образовании комплекса также принимает участие довольно протяженная петля между спиралями  $\alpha$ 3 и  $\alpha$ 4 белка SR $\alpha$  [136].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Функция SRP *S. cerevisiae* практически полностью совпадает с функцией SRP в клетках животных. Было показано, что в дрожжевой системе трансляции *in vitro* в присутствии микросомальных мембран дрожжевая SRP способна узнавать сигнальный пептид, вызывать «проходимый» арест трансляции и посредством взаимодействия с мембранным рецептором доставлять рибосомы к транслокационному участку мембраны [8, 137].

В дрожжевых клетках, как было показано, выбор между SRP-зависимым и SRP-независимым способами транспорта белков протекает в соответствии с гидрофобностью сигнальной последовательности: белки с наиболее гидрофобной последовательностью транспортируются преимущественно по SRP-зависимому пути транспорта [137–139].

Распределение функций между компонентами SRP из *S. cerevisiae* подробно не изучалось. Было показано, что белок Srp14p участвует в аресте трансляции. Известно, что удаление 20 аминокислотных остатков с C-конца в белке SRP14 делает арест трансляции невозможным. Была сконструирована SRP, в состав которой входил Srp14p(-29C) белок, с C-конца которого были удалены 29 аминокислотных остатков. Полученная SRP была вполне стабильна. В дрожжевой системе трансляции *in vitro*, с использованием дрожжевых рибосом и SRP, строгий арест трансляции при синтезе препролактина не наблюда-

ется, не удается детектировать пептиды, синтез которых остановился. Однако оказалось, что мутация в белке Srp14p приводит к накоплению непротранслированной формы препролактинина. Замена в клетках полноценного белка Srp14p на мутантный Srp14p(-29C) не приводила к нарушению в SRP-зависимом транспорте белков. Проблемы с транспортом возникали только при повышенной температуре [8].

Функции остальных компонентов SRP дрожжей детально не изучены, а предполагаются на основе гомологии с компонентами SRP из клеток животных.

В отличие от клеток животных, в клетках *S. cerevisiae* был обнаружен GEF-белок для белка SRβ. Им оказался белок Sec61β, один из белков, которые образуют комплекс Sec61. Цитоплазматический домен белка Sec61β способен производить обмен нуклеотида, связанного с белком SRβ [140].

Какова функция SRβ в дрожжах? Полное удаление гена, кодирующего белок SRb, (как уже говорилось ранее,) имеет тот же фенотип, что удаление гена любого другого компонента SRP или белка SRα, а именно, скорость роста клеток уменьшалась приблизительно в 5 раз. Удаление только его трансмембранного сегмента приводило к приблизительно 10–20% снижению скорости роста клеток [135]. Это значит, что так же, как и в клетках высших эукариот, роль SRβ не ограничивается только лишь связыванием SRα с мембраной. Более того, собственно связывание SRβ с мембраной не так уж и важно для жизни клетки.

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: НАРУШЕНИЕ ГЕНОВ КОМПОНЕНТОВ SRP

Как отмечалось ранее, в дрожжевых клетках с помощью генетических манипуляций можно оценить, насколько важным для клетки процессом является котрансляционный SRP-зависимый транспорт белков в ER. Делеция генов, кодирующих 7SL РНК или белок SRP54, в дрожжевых клетках *S. pombe* летальна [4, 118]. В то же время, нарушение любого гена, кодирующего компонент SRP или SR, в клетках *S. cerevisiae*, не летально, но влечет за собой 4–6 кратное замедление скорости роста клеток. Помимо замедления скорости роста, в клетках, содержащих делецию или делеции генов любого из компонентов SRP или SR, происходит накопление непротранслированных форм некоторых секреторных и мембранных белков [7, 124, 130, 134, 135, 141].

Транспорт белков в ER изучали в условиях постепенного снижения количества компонентов SRP в клетке. Для этого природный промотор гена того или иного компонента SRP заменяли на регулируемый. Изучали биосинтез секреторных и мембранных белков

в условиях постепенного снижения уровня Srp54p в клетке. Так, через несколько часов после пересева клеток на среду без индуктора количество белка Srp54p снижалось настолько, что его не удавалось детектировать в клеточном экстракте с помощью иммуно-блоттинга. Исчезновение Srp54p приводило к постепенному увеличению времени деления клеток и к появлению в клетке предшественников некоторых секреторных и мембранных белков [124]. Подобное накопление предшественников наблюдали при нарушении экспрессии генов, кодирующих белки Sec65p, SR $\alpha$  и SR $\beta$  [130, 134, 135, 141] или при экспрессии мутантных форм белков Sec65p и SR $\beta$ , которые теряли активность при повышенной температуре [142, 143].

А что происходит с остальными компонентами SRP при отсутствии в клетке какого-нибудь компонента? Нарушение гена, кодирующего 7SL РНК, приводит к значительному уменьшению количества белков Srp14p, Srp54p, Srp68p и Sec65p в клетке. Нарушение гена любого из коровых белков (Srp14p, Srp21p, Srp68p, Srp72p) также сопровождается падением количества всех остальных компонентов SRP. В то же время, делеция гена белка Sec65p или Srp54p не влечет за собой уменьшение количества коровых белков и 7SL РНК [7].

Также было изучено изменение количества некоторых шаперонов в условиях постепенного исчезновения белка Srp54p в клетке. Было установлено, что количество белка Hsp70, который принимает участие в посттрансляционном транспорте белков в ER, при отсутствии Srp54p увеличивается в 3–4 раза. Количество белков Ssa1p и Ssa2p, которые также являются участниками SRP-независимого транспорта белков, возрастает в 2–3 раза в условиях отсутствия Srp54p в клетке. Дрожжевой гомолог бактериального шаперона DnaJ – белок Ydj1p – в клетках дрожжей имеет дополнительную функцию, он тоже принимает участие в посттрансляционном транспорте белков в ER, стимулируя АТФ-гидролитическую активность белка Ssa1p. Количество белка Ydj1p при отсутствии Srp54p также увеличивается (в ~ 1,5 раза). Помимо уже перечисленных белков, количество Hsp82p и Hsp104p увеличивается при отсутствии Srp54p так же, как при повышенной температуре [144].

При длительной инкубации клеток без SR $\alpha$  или Srp54p количество непротессированных форм белков проходило через некоторое максимальное значение и снижалось, т.е. дрожжевые клетки адаптировались к нарушению функции SRP [134, 143]. Подобная адаптация не являлась следствием накопления мутаций, поскольку при повторном выключении экспрессии гена Srp54p адаптация не протекала быстрее [143].

Масштабное изучение экспрессии генов при постепенном снижении в клетке количества Srp54p или SR $\beta$  проводили с помощью гибридизации мРНК с ДНК-пробами. Исчезновение этих белков приводит к не менее, чем двукратному изменению уровня транскрипции примерно семисот генов, составляющих ~ 10% их общего числа в геноме дрожжей. Эти изменения коснулись генов белков, которые участвуют во всех ключевых функциях клетки, а именно в синтезе белка, модификации/деградации белков, сворачивании белков, процессинге РНК, репликации и рекомбинации ДНК и др. Причем уровень транскрипции, как правило, уменьшался. Только гены шаперонов и белков, участвующих в посттрансляционном транспорте (Ssa1p, Ssa2p, Ssa3p и Ssa4p) транскрибировались более активно, в некоторых случаях, например для Hsp42, во много раз. Интересно, что количество транскриптов шаперонных белков и белков семейства Ssa с течением времени проходило через максимум и снижалось почти до исходного уровня. Причем падение количества этих транскриптов совпадает с исчезновением в клетке предшественников секреторных и мембранных белков [143].

#### IV. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИЯ SRP И SR ИЗ КЛЕТОК *E. coli*

Открытие и первые исследования состава и функции SRP и SR были сделаны в клетках животных. Поиск по гомологии генов белков SRP54 и SR $\alpha$  из клеток животных в геноме бактерии *E. coli* показал, что ген белка Ffh обнаруживает значительное сходство с геном белка SRP54, а ген белка FtsY похож на ген белка SR $\alpha$  [6, 112]. Структурный аналог 7SL РНК представлен молекулой 4.5S РНК (рис. 1, Е, Ж) [5, 9].

##### СТРУКТУРА Ffh

По аналогии с белком SRP54 в составе Ffh можно выделить три домена: N-концевой домен, центральный G-домен и C-концевой M-домен.

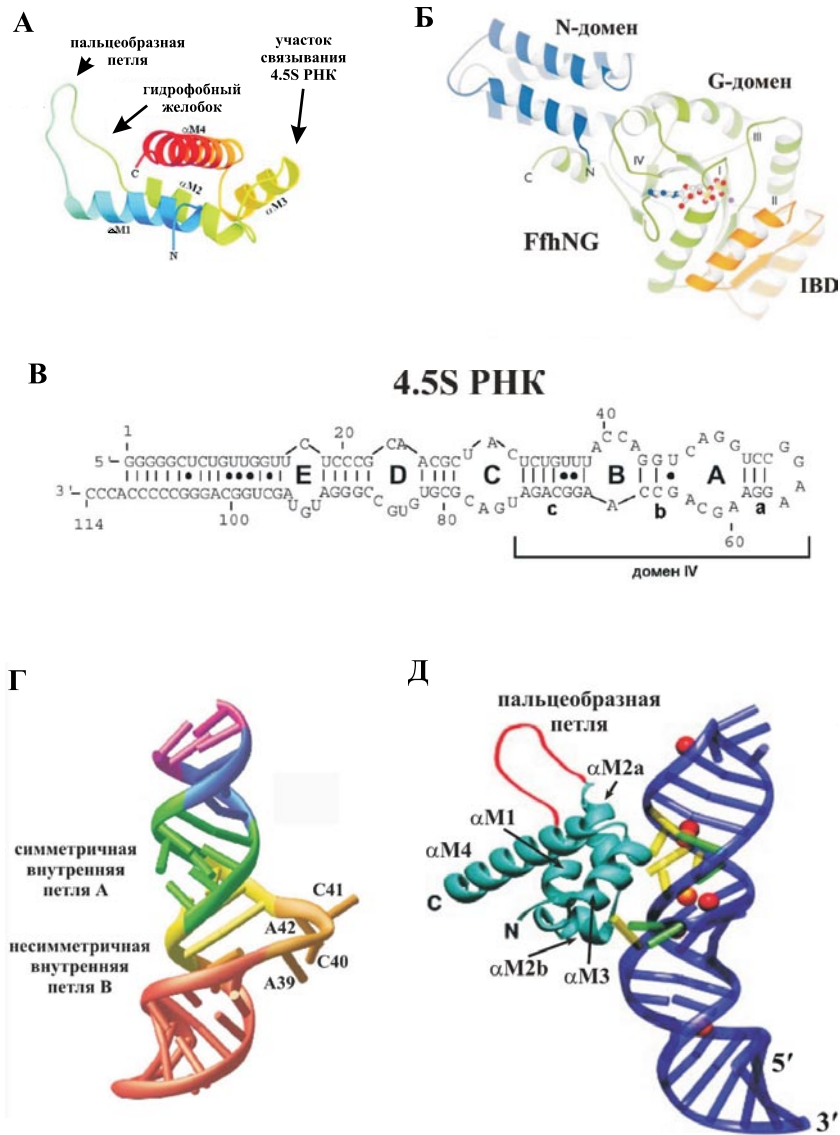
Кристаллическая структура M-домена белка Ffh *T. aquaticus* была определена с разрешением 3,2 Å (рис. 10, А) [145]. M-домен состоит из четырех спиралей, организованных вокруг небольшого гидрофобного ядра. Две антипараллельные спирали,  $\alpha$ M1 и  $\alpha$ M2, образуют основу глубокого желобка. Спирали связаны с одного конца петлей из 19 аминокислотных остатков (так называемая пальцеобразная петля) и с другого конца спиралью  $\alpha$ M4, которая пересекает  $\alpha$ M1 и  $\alpha$ M2 почти перпендикулярно недалеко от центра домена. На поверхности домена, отдаленной от пальцеобразной петли, спираль  $\alpha$ M3 достаточно плотно укладывается напротив консервативного

гидрофобного ядра М-домена. Гидрофобное ядро является наиболее упорядоченным районом М-домена и служит для организации двух ключевых функциональных участков домена, а именно гидрофобного желобка, который вовлечен в связывание сигнального пептида, и аргинин-богатого НТН-мотива, который необходим для связывания 4.5S РНК.

Наиболее значительная структурная особенность М-домена – это глубокий желобок, образованный спиралями  $\alpha$ M1,  $\alpha$ M2,  $\alpha$ M4 и пальцеобразной петлей. Желобок образован почти исключительно гидрофобными аминокислотными остатками. Одиннадцать лейцинов, три фенилаланина, три метионина, два валина и два изолейцина вносят свой вклад в гидрофобность этой поверхности, площадь которой составляет более чем 20% от общей площади поверхности М-домена. Размер желобка и гидрофобный характер консервативных аминокислотных остатков свидетельствуют о том, что желобок связывает сигнальный пептид. В отличие от относительно жестко фиксированных спиралей  $\alpha$ M1,  $\alpha$ M2 и  $\alpha$ M4, которые фланкируют гидрофобный желобок, мотив пальцеобразной петли из девятнадцати аминокислотных остатков (остатки 337–355) достаточно подвижен. Петля образует вытянутую структуру, которая вносит свой вклад в гидрофобность внутренней стороны желобка. Gly336–Pro337 в месте соединения спирали  $\alpha$ M1 и пальцеобразной петли и Pro346–Gly347 в конце петли высоко консервативны и окружают короткий  $\alpha$ -спиральный участок. Не исключено, что при связывании сигнального пептида пальцеобразная петля меняет свою форму, подстраиваясь к форме сигнала.

В кристалле части М-домена сцепляются таким образом, что гидрофобная пальцеобразная петля одной молекулы локализована в гидрофобном желобке другой молекулы. Когда мономер находится в растворе, эта открытая конформация скорее всего экспонирована гидрофобными группами в раствор.

Второй структурный элемент, входящий в состав М-домена белка Ffh, представляет собой НТН-мотив (спирали  $\alpha$ M3,  $\alpha$ M4 и петля между ними), который принимает участие в образовании комплекса Ffh с 4.5S РНК. НТН-мотив М-домена содержит консервативную последовательность <sup>384</sup>RRKRIAKGSGT<sup>399</sup>SVQEV<sup>399</sup>, положительно заряженные аминокислотные остатки которой находятся преимущественно в спирали  $\alpha$ M3. Мутационный анализ показал, что Arg384, Arg387 и Lys390 важны для высокой аффинности к 4.5S РНК. Gly391 и Gly393 консервативной GSG-последовательности также необходимы для связывания 4.5S РНК [145].

Рис. 10. Структуры компонентов SRP *E. coli*.

А – кристаллическая структура М-домена белка Ffh *T. aquaticus* [145],  
 Б – кристаллическая структура NG-домена белка Ffh *T. aquaticus* [146], В – вторичная структура 4.5S РНК *E. coli* [147], Г – кристаллическая структура 4.5S РНК [151], Д – кристаллическая структура М-домена Ffh с фрагментом 4.5S РНК *E. coli* [152].



Кристаллическая структура NG-домена белка Ffh из *T. aquaticus* была определена с разрешением 2,05 Å (рис. 10, Б) [146]. N-домен образован четырьмя  $\alpha$ -спиралями. G-домен содержит плотное гидрофобное ядро. В центре G-домена находится семитяжевой антипараллельный  $\beta$ -лист, окруженный  $\alpha$ -спиралями. G-домен имеет структуру, характерную для всех типов GTPаз с небольшими особенностями. Во-первых, мотив II G-домена белка Ffh содержит вставку в 50 аминокислотных остатков (insertion box domain, IBD), которая удлиняет центральный  $\beta$ -лист на два тяжа, во-вторых, C-концевая  $\alpha$ -спираль имеет свое, специфическое для Ffh, положение, она принимает участие в упаковке гидрофобного ядра N-домена [146].

#### СТРУКТУРА 4.5S РНК

4.5S РНК *E. coli* содержит 114 нуклеотидных остатков и представляет собой довольно протяженную спираль (рис. 10, В), на конце которой находится консервативная тетра нуклеотидная петля GNRA-семейства (где N – любой нуклеотид, R – пурин). Также внутри 4.5S РНК встречаются выпетливания. Фрагмент 4.5S РНК, содержащий концевую тетра нуклеотидную петлю, симметричную внутреннюю А-петлю, внутреннюю несимметричную В-петлю и спиральный участок между петлями В и С, имеет структуру, схожую с доменом IV 7SL РНК. Остальной участок 4.5S РНК имеет некоторые сходства со спиралью h5 7SL РНК. Было найдено, что молекула 4.5S РНК имеет изгиб, находящийся в несимметричной В-петле [147].

С помощью метода ЯМР была определена структура 28-нуклеотидного участка, который содержал тетра нуклеотидную петлю на конце 4.5S РНК и внутреннюю симметричную А-петлю. Этот отрезок 4.5S РНК имеет структуру спирали, внутренняя А-петля образована преимущественно за счет стэкинг-взаимодействий, концевая петля также хорошо структурирована [148].

Также методом ЯМР была определена структура 43-нуклеотидного участка 4.5S РНК, который соответствовал домену IV [149]. Структура внутренней А-петли и концевой тетра нуклеотидной петли полностью совпадала с ранее полученной. В-петля довольно подвижна, но сохраняет определенную структуру. Более протяженная цепь В-петли продолжает большую бороздку, образуя небольшой выступ. Также в районе несимметричной В-петли наблюдался перегиб 4.5S РНК. Были получены данные о том, что спиральные участки, разделенные перегибом, могут двигаться друг относительно друга [149, 150].

Позднее с разрешением 2,7 Å была определена кристаллическая структура 45-нуклеотидного фрагмента 4.5S РНК, который гомологичен домену IV 7SL РНК (рис. 10, Г) [151]. Кристаллическая структура имела некоторые отличия от структуры, определенной методом ЯМР. В кристаллической структуре внутренняя А-петля образована преимущественно за счет неканонического спаривания оснований. В результате образуется плоская малая бороздка, потенциально доступная для взаимодействия с белком. В несимметричной В-петле основания А39, С40 и А42 образуют стэкинг-взаимодействия, основание С41 оказывается выпетленным. С противоположной стороны В-петли неспаренное основание А67 продолжает стэкинг-взаимодействия между спиралью b и c [151].

#### СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА 4.5S РНК/FFHM

В работе [152] с разрешением 1,8 Å была определена кристаллическая структура комплекса участка 4.5S РНК длиной 48 нуклеотидных остатков, который соответствует домену IV, с М-доменом белка Ffh (рис. 10, Д). При образовании комплекса с 4.5S РНК структура М-домена практически не претерпевает каких-либо изменений. Во взаимодействии с 4.5S РНК участвует НТН-мотив. Причем в данном случае в образовании комплекса принимает участие только  $\alpha$ М3 спираль, в отличие от взаимодействия НТН-домена с ДНК. Спираль  $\alpha$ М3 взаимодействует с малой бороздкой 4.5S РНК, образуя контакты с нуклеотидными остатками из внутренних А и В-петель. Внутренняя симметричная А-петля, экспонируя в малую бороздку неканонические пары гетероциклических оснований, создает уникальную поверхность для контакта с М-доменом.

При образовании комплекса структура 4.5S РНК и особенно ее несимметричной В-петли значительно изменяется. Неспаренный остаток аденозина А67 остается вовлеченным в стэкинг-взаимодействия внутри спирали. Четыре нуклеотида А39–С40–С41–А42 оказываются полностью выпетленными из спирали. Нуклеотиды А39, С40 и С41 находятся в стэкинге и располагаются перпендикулярно оси спирали, образуя изгиб. Основание А42 не участвует в стэкинге и связывает выпетливание и спираль. Уникальное положение нуклеотида А39 позволяет ему контактировать с симметричной петлей А и  $\alpha$ М3 спиралью М-домена. Также плотная сеть контактов обнаружена между спиралью  $\alpha$ М2 М-домена и парой оснований А47–С62 из симметричной А-петли 4.5S РНК [152]. Помимо прямых РНК–белковых контактов, молекулы воды и ионы металлов также вносят вклад во взаимодействие 4.5S РНК с М-доменом Ffh [150].

## СТРУКТУРА FtsY

Основываясь на гомологии белка FtsY с SR $\alpha$ , в структуре FtsY также можно выделить три домена: А-домен, N-домен и G-домен. NG-домен обладает значительным сходством с другими SRP GTPазами [6, 112]. К сожалению, до сих пор не удалось получить кристаллы полноразмерного белка FtsY *E.coli*, пригодные для определения пространственной структуры. Отдельно NG-домен хорошо кристаллизуется [153].

Кристаллическая структура NG-домена белка FtsY (аминокислотные остатки 197–497) *T. aquaticus* была определена с разрешением 2,2 Å (рис. 11, А) [154]. N-домен также содержит четыре  $\alpha$ -спирали, упакованные в гидрофобное ядро. G-домен содержит смешанный  $\alpha$ - $\beta$  мотив. В центре G-домена расположен восьмитыжевой  $\beta$ -лист, окруженный семью  $\alpha$ -спиралями. Присутствуют характерные для всех типов GTPаз структурные мотивы I–IV [66, 154].

## СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА FfhNG/FtsYNG

Значительные успехи были достигнуты в структурных исследованиях взаимодействия белка Ffh с мембранным рецептором SRP – белком FtsY. Было показано, что комплекс между белками образуется только в присутствии негидролизуемого аналога GTP, в присутствии GTP комплекс не образуется [155]. В 2004 году были независимо получены две кристаллические структуры комплекса FfhNG/FtsYNG *T. aquaticus* в присутствии негидролизуемого аналога GTP (GMPPCP) с разрешением 1,9 Å и 2,05 Å (рис. 11, Б, В) [156, 157]. Поверхность взаимодействия между молекулами довольно большая, в образовании комплекса принимают участие N- и G-домены обеих молекул. В структуре комплекса можно провести псевдо-ось симметрии второго порядка, т.е. при повороте на 180° структура почти совмещается сама с собой, белок Ffh занимает в пространстве место белка FtsY. В области взаимодействия можно выделить несколько контактов. Мотивы II (точнее IVD-петли) обоих белков образуют Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, есть контакты между  $\alpha 3$  спиралями партнеров; консервативный мотив ALLEADV в N-домene образует сеть контактов со спиралями  $\alpha 3$  и  $\alpha 4$  партнера. При образовании комплекса NG-домены обоих белков претерпевают значительные структурные изменения. Мотив II (аминокислотные остатки 133–145, IVD-петля) и мотив III (аминокислотные остатки 187–192) обоих белков изменяют свою конформацию и в составе комплекса скрепляют верхнюю и боковую части каталитического центра. N-домен немного поворачивается в пространстве, за счет чего между N- и G-доменами возникает более плотный контакт.

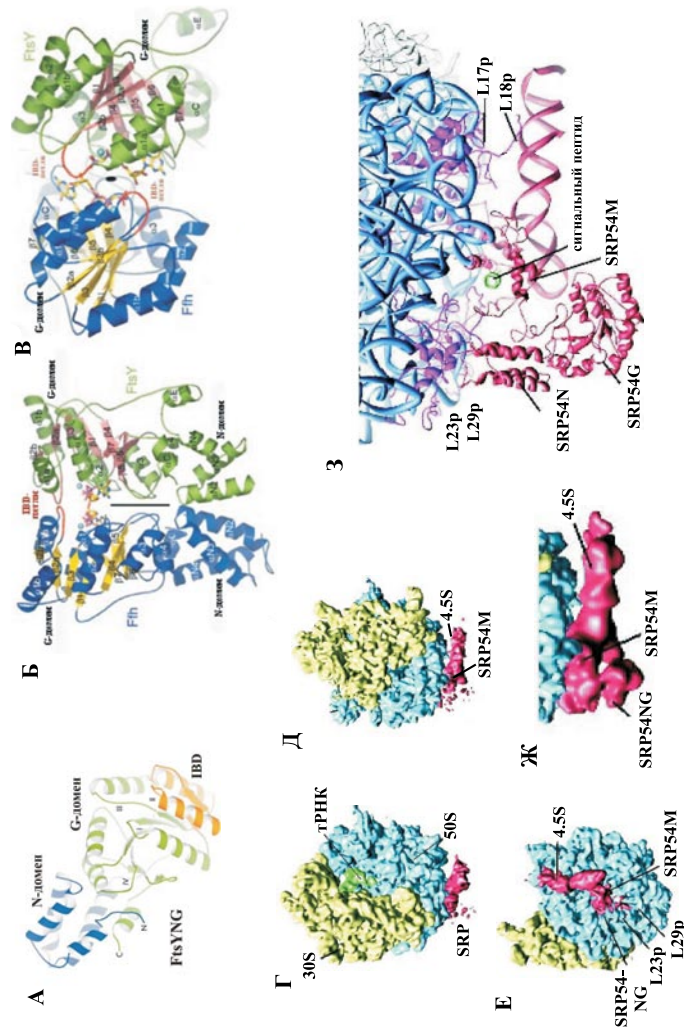


Рис. 11. Структуры компонентов SR и комплекса SRP с рибосомой.

А – кристаллическая структура NG-домена белка FtsY *T. aquaticus* [146], Б, В – кристаллическая структура комплекса FtsYNG/FtsYNG *T. aquaticus* в двух проекциях [156, 157]. Положение псевдо-оси симметрии второго порядка отмечено черной полоской, Г, Д и Е – криоэлектронная структура комплекса рибосома/сигнальный пептид/SRP [158, 159], Ж – положение компонентов SRP в комплексе с рибосомой, З – участки взаимодействия SRP с рибосомой.

В каталитическом центре, который находится в пространстве между молекулами, находятся две молекулы GMPPCP, два иона магния и несколько молекул воды. В связывании GMPPCP принимают участие все четыре мотива, характерные для всех типов GTPаз. Молекулы GMPPCP расположены друг относительно друга по принципу «голова к хвосту». Причем есть непосредственный контакт между нуклеотидами:  $\gamma$ -фосфат одной молекулы GMPPCP образует водородную связь с 3'-ОН группой рибозы другой молекулы GMPPNP. 3'-ОН группа выступает в качестве ОН-донорной группы.  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатные группы каждой молекулы GMPPCP скоординированы ионом магния. Также в непосредственной близости от  $\gamma$ -фосфата находится молекула воды, которая проводит атаку на  $\gamma$ -фосфат при гидролизе [156, 157].

#### СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА РИБСОМА/СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД/SRP

Сравнительно недавно исследователям удалось наблюдать контакты между рибосомой и SRP из *E. coli*. Одновременно двумя независимыми группами ученых были получены с помощью крио-электронной микроскопии с разрешением 16,0 Å и 9,4–13,0 Å структуры комплекса SRP с рибосомой, транслирующей сигнальную последовательность [158, 159]. Полученные структуры полностью совпали. В обоих случаях в качестве сигнального пептида был использован трансмембранный сегмент белка FtsQ, который способен взаимодействовать с SRP. Наблюдали некоторую электронную плотность в непосредственной близости от выхода из рибосомного туннеля. Скорее всего, данная плотность относилась к сигнальному пептиду в конформации  $\alpha$ -спирали, поскольку при данном разрешении не удалось определить точное расположение сигнального пептида после его выхода из рибосомного туннеля. При разрешении 9,4 Å в распределении электронной плотности, которая отображала SRP, наблюдали некоторую гетерогенность, обусловленную подвижностью NG-домена белка Ffh (рис. 11, Г–Е). При более низком разрешении (9,5–12 Å) наблюдали точное расположение SRP в комплексе с рибосомой (рис. 11, Ж). Расположение в пространстве М- и NG-доменов белка Ffh относительно друг друга совпадает с расположением доменов белка SRP54 в составе комплекса эукариотическая рибосома/сигнальный пептид/SRP [59, 158, 159]. При связывании сигнального пептида М-домен белка Ffh претерпевает некоторые структурные перестройки, наблюдается небольшой поворот спирали  $\alpha 1$ . Структура NG-домена белка Ffh также изменяется по сравнению со структурой отдельного белка: происходит небольшой сдвиг  $\alpha$ -спиралей N-домена, данная струк-

тура обнаруживает значительное сходство со структурой NG-домена в составе комплекса FfhNG/FtsYNG [156, 157, 159].

В комплексе между рибосомой и SRP наблюдали четыре контакта. Первый контакт образуют N-домен белка Ffh и рибосомные белки L23 и L29. Также G-домен располагается в пространстве недалеко от рибосомного белка L29. Второй контакт образуют M-домен белка Ffh, спираль h24 рибосомной 23S РНК и рибосомные белки L24 и L22. В третий контакт вовлечены 4.5S РНК (возможно, нуклеотидные остатки 72–76) и рибосомный белок L18. Этот контакт находится рядом с местом контакта 4.5S РНК и 23S РНК, обнаруженный с помощью фотохимического сшивания [160]. Четвертый контакт образуется между M-доменом и спиралью h59 рибосомной 23S РНК [158, 159].

Помимо комплекса SRP с рибосомой, транслирующей сигнальный пептид, авторам работы [159] удалось получить комплекс SRP со свободной рибосомой. Как оказалось, в данном случае присутствует только первый контакт, образованный N-доменом белка Ffh и рибосомными белками L23 и L29. Авторы выдвигают предположение, что отсутствие прямых контактов между M-доменом белка Ffh со свободной рибосомой позволяет M-домену сканировать растущий пептид на предмет присутствия сигнальной последовательности. И только после взаимодействия M-домена с сигнальным пептидом происходит образование второго, третьего и четвертого контактов.

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Ffh С 4.5S РНК

Как уже отмечалось, 4.5S РНК взаимодействует с M-доменом Ffh, причем со стороны 4.5S РНК во взаимодействие вовлечен участок, гомологичный домену IV эукариотической SRP РНК. Образование комплекса 4.5S РНК с белком Ffh вызывает конформационные изменения в структуре 4.5S РНК [161]. Мутации в концевой тетра-нуклеотидной петле не оказывали значительного эффекта на образование комплекса Ffh/4.5S РНК. Мутации во внутренних спиральных A и B значительно снижали способность образовывать комплекс [155]. Было показано, что белок Ffh защищает от атаки гидроксильными радикалами участок 4.5S РНК, гомологичный домену IV 7SL РНК [147], причем концевая тетра-нуклеотидная петля не защищается. Недавно было обнаружено, что NG-домен Ffh взаимодействует с 4.5S РНК в районе внутренней C-петли [162]. Будучи разделенными, M- и NG-домены могут образовывать комплекс между собой. Причем при образовании комплекса наблюдается сшивка между аминокислотными остатками 231 в G-домене и 377 в M-домене. При связывании 4.5S РНК это взаимодействие нарушается, что свидетельствует об

изменении пространственного расположения доменов друг относительно друга [162]. Помимо перестановки доменов, 4.5S РНК влияет на их стабильность. В растворе спирали М-домена Ffh не имеют плотной упаковки, образуют структуру «расплавленной глобулы». Это подтверждено данными кругового дихроизма, а также тем фактом, что термическая денатурация М-домена происходит некооперативно [163, 164]. М-домен оказывается весьма чувствительным к действию протеаз. NG-домен обладает несколько более стабильной структурой, и подвергается протеолитическому расщеплению значительно хуже, чем М-домен. Присутствие 4.5S РНК приводит к существенной стабилизации доменов, уменьшению скорости расщепления Ffh на два домена, кооперативному плавлению М-домена при термической денатурации [163].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: ОБЩАЯ СХЕМА РАБОТЫ SRP БАКТЕРИЙ

После обнаружения структурной гомологии между SRP *E. coli* и отдельными компонентами SRP из клеток животных, естественно было предположить сходство их функций. В одной из первых работ, посвященных изучению функции бактериальной SRP, была исследована способность белка Ffh к взаимодействию с сигнальным пептидом. При трансляции препролактина в системе WGS в присутствии клеточного экстракта *E. coli*, в состав которого входит Ffh, наблюдали сшивку между сигнальным пептидом и белком Ffh [165]. Как известно, сигнальный пептид взаимодействует с гидрофобным участком М-домена белка Ffh. Тем не менее, наблюдалась также и сшивка между сигнальным пептидом и NG-доменом [163, 166]. Выход сшивки между пептидом и Ffh увеличивался при увеличении гидрофобности пептида [167]. Исследования *in vivo* так же показали, что белки с более гидрофобной сигнальной последовательностью транспортируются преимущественно по SRP-пути [168].

SRP связывает сигнальный пептид еще до завершения синтеза полноразмерного белка рибосомой. Было показано, что белок Ffh может образовывать сшивку с белком большой рибосомной субъединицы L23 [11]. Было также обнаружено, что сшивка образуется между N-доменом и белком L23. Присутствие FtsY не оказывало на эффективность образования сшивки никакого влияния [12]. Также с помощью фотохимического сшивания был обнаружен контакт между остатком U84 4.5S РНК и нуклеотидными остатками 2828–2837 23S рибосомной РНК [160]. Структура комплекса рибосома/сигнальный пептид/SRP позволила более детально отследить контакты между рибосомой, сигнальным пептидом и SRP [158, 159]. Хотя и было пока-

зано, что бактериальная SRP взаимодействует с рибосомой, вопрос об остановке трансляции в этом комплексе пока остается открытым.

Рецептором бактериальной SRP является белок FtsY. В клетке FtsY локализован частично на мембране, частично в цитоплазме. Однако в составе FtsY нет трансмембранных сегментов, скорее всего, это периферический мембранный белок [169]. Никакого структурного или функционального аналога SRP, посредством которого FtsY может быть локализован на мембране, найти не удалось. Возможно, N-концевой A-домен белка FtsY, который содержит много кислотных остатков, способен взаимодействовать с фосфолипидами. Действительно, если заменить A-домен на трансмембранный сегмент, то такой химерный белок вполне функционален [170]. Экспрессия отдельных A-, NG- и G-доменов и изучение их клеточной локализации показало, что NG- и G-домены, также как и A-домен, находятся на мембране, ведут себя как периферические мембранные белки [171]. Исследования *in vitro* показали, что NG-домен и полноразмерный FtsY белок способны взаимодействовать с фосфолипидами, особенно анионными [172].

Встраивание в мембрану белка FtsY происходит, скорее всего, котрансляционно, причем присутствие липидного бислоя оказывается важным при формировании NG-домена. Встраивание между A- и NG-доменами протяженного линкера (свыше 35 аминокислотных остатков) сохраняет способность мутантного белка взаимодействовать с мембраной, но полностью нарушает его функцию [173].

Существуют противоречивые мнения о важности A-домена для функции FtsY. Так, в одной работе [170] было показано, что частичное или полное удаление A-домена приводит к гибели клеток. В другой работе [174], напротив, были получены данные о том, что NG-домен, содержащий на N-конце 1, 4 или 9 аминокислотных остатков от A-домена, вполне функционален.

Делеция генов, кодирующих FtsY, Ffh и 4.5S РНК, летальна [169, 175–177]. Возможно лишь анализировать происходящее в клетке при постепенном уменьшении количества FtsY, Ffh или 4.5S РНК. Такое уменьшение может быть вызвано исключением регулируемого промотора, введенного в геном бактерии перед соответствующим геном. Уменьшение количества Ffh и FtsY приводит к накоплению предшественников мембранных и секреторных белков [169, 175, 178–180]. Достаточно неожиданным было то, что и суперэкспрессия FtsY также сопровождается накоплением этих предшественников [169, 178]. Уменьшение количества 4.5S РНК привело к снижению скорости элонгации на ~ 10%, а также наблюдалось накопление непротессированных форм (предшественников) секреторных белков [176,



180]. Следует заметить, что нарушение работы SRP не приводило к тому, что транспорт и последующее созревание белков прекращались вовсе, наряду с предшественниками в клетке обнаруживались и процессированные формы белков. Скорее всего, предшественники мембранных и секреторных белков способны использовать альтернативные пути транспорта в/через мембрану [179, 181].

Иными словами, Ffh, 4.5S РНК и FtsY являются структурными и функциональными гомологами SRP и SR из клеток животных. Однако бактериальная SRP не могла заменить эукариотическую в системе трансляции в экстрактах из проростков пшеницы (WGS) *in vitro*. Даже трансляция мРНК бактериального белка пре- $\beta$ -лактамазы в системе WGS в присутствии микросомальных мембран приводила к интеграции белка в мембрану только в присутствии SRP из клеток животных. Бактериальная SRP не вызывала ареста трансляции, и также не происходило проникновения синтезированной пре- $\beta$ -лактамазы в мембрану [182]. Химерная SRP(Ffh), в которой белок SRP54 заменен белком Ffh [183], была стабильной, в системе WGS была способна узнавать сигнальный пептид растущего препролактина, вызывать арест трансляции, но оказалась не способной вызывать транслокацию препролактина в мембрану. Скорее всего, несмотря на значительную структурную и функциональную гомологию Ffh с белком SRP54, белок Ffh не способен взаимодействовать с SR $\alpha$ . Действительно, если в микросомальной мембране белок FtsY присутствовал вместо SR $\alpha$ , то бактериальная SRP была способна в системе WGS котрансляционно взаимодействовать с сигнальным пептидом растущего препролактина и транслоцировать его в микросомальную мембрану GTP-зависимым способом [184]. Таким образом, взаимодействие SRP54 и Ffh с сигнальным пептидом и рибосомой оказалось универсальным. Напротив, взаимодействия SRP54 с SR $\alpha$  и Ffh с FtsY оказались специфичными. Этот вывод был также подтвержден в опытах *in vivo*. SRP54 оказался не способен функционально заменить Ffh в бактериальной клетке. SRP54 мог взаимодействовать с 4.5S РНК, с сигнальным пептидом, но не мог образовывать комплекс с FtsY [185].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ SRP И SR, ГИДРОЛИЗ GTP

Взаимодействие между Ffh и FtsY осуществляется посредством NG-доменов обоих белков. В 2004 году было показано, что M-домен белка Ffh также взаимодействует с FtsY [186]. Несмотря на то, что G-домены обоих белков обладают способностью связывать и гидролизовать GTP, по отдельности эти белки связывают GTP с очень низ-

кой эффективностью, и практически не гидролизуют его. Гидролиз GTP протекает только при образовании комплекса Ffh/4.5S РНК/FtsY. Мутация в белке FtsY (D441N), приводящая к смене нуклеотидной специфичности с GTP на XTP, позволила прояснить, каким образом протекает гидролиз. При образовании комплекса происходит гидролиз GTP и XTP, т.е. Ffh и FtsY выступают в качестве GAP-белков друг для друга [187].

FtsY в свободном состоянии связывает приблизительно с одинаковой эффективностью как GTP, так и GDP. Самопроизвольный обмен нуклеотидов проходит очень быстро, его скорость сопоставима со скоростью обмена другой GTPазы, например белка Ras, в присутствии GEF-белка. Возможно, IBD вставка, которая характерна для SRP GTPаз, является внутренним нуклеотид-обменным фактором [188]. Аналогичные результаты были получены при изучении GTP-связывающей активности белка Ffh. Белок Ffh как в свободном виде, так и в присутствии 4.5S РНК или рибосомы, взаимодействует с GTP и GDP с одинаковой эффективностью. Обмен нуклеотидов протекает самопроизвольно с большой скоростью. На основе полученных данных можно сделать предположение о том, что, скорее всего, в клетке происходит спонтанный обмен нуклеотидов, и белок Ffh, находится преимущественно в комплексе с GTP [189].

Образование комплекса SRP/FtsY сопровождается конформационными перестройками в белке FtsY [190]. Следует отметить, что при образовании комплекса SRP/FtsY специфичность белка FtsY к GTP увеличивается в 1000 раз. Иными словами, SRP стимулирует GTP-связывающую и гидролизующую активность FtsY [191].

Интересно проследить, какую функцию выполняет 4.5S РНК при образовании комплекса SRP/FtsY. Белок Ffh не способен сам взаимодействовать с FtsY [187]. Известно, что FtsY не взаимодействует и с 4.5S РНК. Однако мутации в концевой тетрануклеотидной петле 4.5S РНК, нарушающие структуру петли и прилегающего к ней спирального участка, не влияли на связывание 4.5S РНК с белком Ffh, но нарушали взаимодействие SRP с FtsY [192]. Как оказалось, 4.5S РНК выступает в качестве катализатора при образовании комплекса Ffh с FtsY, значительно ускоряя как образование комплекса, так и его диссоциацию [193]. Было показано, что 4.5S РНК ускоряла в 400 раз процесс образования комплекса Ffh/FtsY, при этом белки находились в комплексе с GTP. Гидролиз двух молекул GTP протекает значительно быстрее, чем диссоциация комплекса SRP/FtsY [194]. Недавно были получены экспериментальные данные, которые объясняют такое поведение 4.5S РНК. С помощью пробинга с использованием гид-

роксильных радикалов было показано, что в комплексе SRP/FtsY молекула 4.5S РНК располагается в непосредственной близости от места контакта NG-доменов белков Ffh и FtsY, причем FtsYNG может образовывать контакты с 4.5S РНК [195].

Помимо взаимодействия с SRP, белок FtsY взаимодействует с белком SecY, который входит в состав бактериального транслокона. Это взаимодействие наблюдали между очищенными белками *in vitro*, а также при выделении транслокона из клеток происходило совыделение белка FtsY. Данные результаты позволяют сделать предположение, что транслокон может принимать участие в регуляции работы SRP. Возможно, транслокон так же, как и в клетках эукариот, посредством взаимодействия SecY с FtsY индуцирует высвобождение сигнального пептида, которое должно происходить только в присутствии незанятого транслокона [196].

#### ФУНКЦИЯ SRP И SR: РОЛЬ SecA

При взаимодействии рибосомы, синтезирующей мембранный или секреторный белок, с транслоконом происходит объединение SRP-зависимого и независимого путей транспорта. Так, после высвобождения из комплекса с SRP сигнальный пептид мог быть сшит с белком SecY (один из компонентов бактериального транслокона) и с белком SecA (один из участников посттрансляционного SRP-независимого транспорта белков) [197]. Для некоторых белков, которые транспортируются по SRP-зависимому механизму, присутствие SecA совершенно необходимо [198]. Дальнейшие исследования показали, что SRP и SecA работают независимо друг от друга, SRP узнает сигнальный пептид и направляет транслирующую рибосому к мембране, а SecA принимает участие в транслокации белка через мембрану [199, 200].

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ 4.5S РНК

Измерение количества Ffh и 4.5S РНК в клетке показало, что 4.5S РНК в 4 раза больше, чем Ffh – около 400 молекул на 10000 рибосом. Повышенное содержание 4.5S РНК по отношению к Ffh позволило предположить, что 4.5S РНК имеет дополнительную функцию в клетке [198]. Действительно, 4.5S РНК способна образовывать комплекс с белком EF-G, который является элонгационным фактором (elongation factor G, EF-G). В 4.5S РНК присутствует последовательность из десяти нуклеотидных остатков, которая полностью совпадает с последовательностью сарцин-рициновой петли 23S рРНК [202]. 4.5S РНК конкурирует с 23S РНК за связывание с EF-G, т.е. 4.5S РНК

может принимать какое-то участие в синтезе не только секреторных и мембранных, но и цитоплазматических белков [202–204]. Следует учитывать, что взаимодействие 4.5S РНК с EF-G значительно слабее, чем взаимодействие с Ffh. В клетке только 10% 4.5S РНК взаимодействует с EF-G, в то время как белок Ffh полностью вовлечен в образование SRP [202, 203, 205].

#### **V. СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ SRP И SR ИЗ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, *S. cerevisiae* И *E. coli***

Подробное рассмотрение структуры и функции SRP из разных организмов позволяет нам отследить некоторые сходства и различия в строении и работе SRP. Основное сходство в структуре заключается в том, что во всех организмах сигналузнающая частица представляет собой рибонуклеопротеид, т.е. комплекс по крайней мере одного белка и одной молекулы РНК. Белок Ffh, входящий в состав так называемой «минимальной SRP» *E. coli*, содержит структурные элементы, которые также присутствуют в его эукариотическом гомологе – белке SRP54. Это GTP-разный домен, участок связывания РНК и гидрофобный участок, ответственный за связывание сигнального пептида. Также следует отметить, что участок SRP РНК из разных организмов, участвующий в образовании комплекса с белком Ffh(SRP54), имеет схожую структуру.

Основные структурные отличия между прокариотической и эукариотической SRP заключаются в том, что эукариотическая SRP значительно больше прокариотической. Эукариотическая SRP содержит РНК большего размера и дополнительные белковые компоненты (см. таблицу). В структуре эукариотической SRP можно выделить два домена, Alu- и S-, причем Alu-домен отсутствует в прокариотической SRP. Также можно наблюдать отличия в структуре Alu-домена из разных эукариотических организмов.

Что касается функции, то основное сходство заключается в том, что SRP всегда присутствует в клетке и является основным участником котрансляционного транспорта белка. Сигналузнающая частица из любого организма узнает N-концевой сигнальный пептид и направляет рибосомы, синтезирующие секреторные или мембранные белки, к клеточной мембране (в случае прокариот) или к мембране ER (в случае эукариот). Затем SRP специфически взаимодействует с SR и для этого нужен GTP. Отличие в работе эукариотической и прокариотической SRP заключается в том, что эукариотическая SRP способна вызывать арест трансляции (строгий или «проходимый»)

Таблица.  
**Состав SRP из клеток млекопитающих, *S. cerevisiae* и *E. coli***

		Млекопитающие	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>
SRP	Alu-домен	SRP9 SRP14	Srp21p Srp14p	
	S-домен	SRP19 SRP54 SRP68 SRP72	Sec65p Srp54p Srp68p Srp72p	Ffh
	PHK	7SL	scR1	4.5S
SR		SR $\alpha$ SR $\beta$	SR $\alpha$ SR $\beta$	FtsY

растущего пептида посредством взаимодействия Alu-домена SRP с рибосомой. Вполне возможно, большой размер эукариотических клеток требует остановки трансляции или ее замедления, в то время как в прокариотических клетках из-за их маленького размера остановка трансляции не нужна. Нельзя оставить без внимания также возможность того, что прокариотическая SRP может вызывать арест трансляции каким-либо другим способом. Однако следует помнить, что все данные об остановке трансляции были получены в системе *in vitro*.

Все выше сказанное справедливо и для SR. В клетках эукариот SR представляет собой комплекс двух белков, один из которых является гомологом прокариотического рецептора SRP (SR $\alpha$ ), а второй – дополнительный белок (SR $\beta$ ). Функция SR из любого организма заключается в специфическом узнавании SRP GTP-зависимым способом. Однако при работе эукариотического рецептора происходит гидролиз дополнительной молекулы GTP белком SR $\beta$ .

Иными словами, SRP – универсальный компонент клетки, поскольку участвует в жизненно необходимом процессе. Это обязательно рибонуклеопротеид. Но при переходе от прокариотических организмов к эукариотическим можно наблюдать значительные структурные и функциональные различия между SRP из этих царств. Скорее всего, усложнение организма привело к возникновению новых требований к работе и регуляции работы SRP.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы был достигнут значительный успех в расшифровке структур основных участников SRP-зависимого транспорта белков в клетках млекопитающих, *S. cerevisiae* и *E. coli*. Это позволило пролить свет на некоторые вопросы функционирования SRP в клетке, например, каким образом осуществляется взаимодействие SRP и рибосомы в эукариотических клетках, каким образом происходит взаимная активация гидролиза GTP GTPазными доменами белков Ffh и FtsY, какую роль при работе SRP играет  $\beta$ -субъединица SR и т.д. Однако, достигнутый успех не решил всех проблем понимания работы самой SRP и ее роли в транспорте белков. Многие вопросы функционирования SRP остаются пока без ответа.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Walter, P., Blobel, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 7112–7116.
2. Walter, P., Blobel, G. (1982) Nature, **299**, 691–698.
3. Pool, M.R. (2005) Mol. Membr. Biol., **22**, 3–15.
4. Brennwald, P., Liao, X., Holm, K., Porter, G., Wise, J.A. (1988) Mol. Cell Biol., **8**, 1580–1590.
5. Poritz, M.A., Strub, K., Walter, P. (1988) Cell, **55**, 4–6.
6. Romisch, K., Webb, J., Herz, J., Prehn, S., Frank, R., Vingron, M., Dobberstein, B. (1989) Nature, **340**, 478–482.
7. Brown, J.D., Hann, B.C., Medzihradsky, K.F., Niwa, M., Burlingame, A.L., Walter, P. (1994) EMBO J., **13**, 4390–4400.
8. Mason, N., Ciufu, L.F., Brown, J.D. (2000) EMBO J., **19**, 4164–4174.
9. Miller, J.D., Bernstein, H.D., Walter, P. (1994) Nature, **367**, 657–659.
10. Muller, M., Koch, H.G., Beck, K., Schafer, U. (2001) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **66**, 107–157.
11. Ullers, R.S., Houben, E.N., Raine, A., ten Hagen-Jongman, C.M., Ehrenberg, M., Brunner, J., Oudega, B., Harms, N., Luirink, J. (2003) J. Cell Biol., **161**, 679–684.
12. Gu, S.Q., Peske, F., Wieden, H.J., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W. (2003) RNA, **9**, 566–573.
13. Egea, P.F., Stroud, R.M., Walter, P. (2005) Curr. Opin. Struct. Biol., **15**, 213–220.
14. Walter, P., Blobel, G. (1983) Cell, **34**, 525–533.
15. Gundelfinger, E.D., Di Carlo, M., Zopf, D., Melli, M. (1984) EMBO J., **3**, 2325–2332.
16. Zwieb, C. (1985) Nucleic Acids Res., **13**, 6105–6124.
17. Larsen, N., Zwieb, C. (1991) Nucleic Acids Res., **19**, 209–215.
18. Andreazzoli, M., Gerbi, S.A. (1991) EMBO J., **10**, 767–777.
19. Lutcke, H. (1995) Eur. J. Biochem., **228**, 531–550.
20. Andersen, E.S., Rosenblad, M.A., Larsen, N., Westergaard, J.C., Burks, J., Wower, I.K., Wower, J., Gorodkin, J., Samuelsson, T., Zwieb, C. (2006) Nucleic Acids Res., **34**, D163–168.

21. *Sinha, K.M., Gu, J., Chen, Y., Reddy, R.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6853–6859.
22. *Sinha, K., Perumal, K., Chen, Y., Reddy, R.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 30826–30831.
23. *Strub, K., Walter, P.* (1990) *Mol. Cell Biol.*, **10**, 777–784.
24. *Strub, K., Walter, P.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9747–9751.
25. *Strub, K., Moss, J., Walter, P.* (1991) *Mol. Cell Biol.*, **11**, 3949–3959.
26. *Wild, K., Weichenrieder, O., Strub, K., Sinning, I., Cusack, S.* (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 72–81.
27. *Bovia, F., Bui, N., Strub, K.* (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2028–2035.
28. *Bui, N., Wolff, N., Cusack, S., Strub, K.* (1997) *RNA*, **3**, 748–763.
29. *Chang, D.Y., Newitt, J.A., Hsu, K., Bernstein, H.D., Maraia, R.J.* (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1117–1122.
30. *Birse, D.E., Kapp, U., Strub, K., Cusack, S., Aberg, A.* (1997) *EMBO J.*, **16**, 3757–3766.
31. *Weichenrieder, O., Wild, K., Strub, K., Cusack, S.* (2000) *Nature*, **408**, 167–173.
32. *Weichenrieder, O., Kapp, U., Cusack, S., Strub, K.* (1997) *RNA*, **3**, 1262–1274.
33. *Weichenrieder, O., Stehlin, C., Kapp, U., Birse, D.E., Timmins, P.A., Strub, K., Cusack, S.* (2001) *RNA*, **7**, 731–740.
34. *Siegel, V., Walter, P.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1801–1805.
35. *Lutcke, H., Prehn, S., Ashford, A.J., Remus, M., Frank, R., Dobberstein, B.* (1993) *J. Cell Biol.*, **121**, 977–985.
36. *Iakhiaeva, E., Bhuiyan, S.H., Yin, J., Zwieb, C.* (2006) *Protein Sci.*, **15**, 1290–1302.
37. *Iakhiaeva, E., Yin, J., Zwieb, C.* (2005) *J. Mol. Biol.*, **345**, 659–666.
38. *Lingelbach, K., Zwieb, C., Webb, J.R., Marshallsay, C., Hoben, P.J., Walter, P., Dobberstein, B.* (1988) *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9431–9442.
39. *Zwieb, C.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 15650–15656.
40. *Zwieb, C.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2955–2960.
41. *Chittenden, K., Black, S.D., Zwieb, C.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 20497–20502.
42. *Black, S.D., Gowda, K., Chittenden, K., Walker, K.P. 3rd, Zwieb, C.* (1997) *Eur. J. Biochem.*, **245**, 564–572.
43. *Wild, K., Sinning, I., Cusack, S.* (2001) *Science*, **294**, 598–601.
44. *Oubridge, C., Kuglstatter, A., Jovine, L., Nagai, K.* (2002) *Mol. Cell.*, **9**, 1251–1261.
45. *Hainzl, T., Huang, S., Sauer-Eriksson, A.E.* (2002) *Nature*, **417**, 767–771.
46. *Sauer-Eriksson, A.E., Hainzl, T.* (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 64–70.
47. *Zopf, D., Bernstein, H.D., Johnson, A.E., Walter, P.* (1990) *EMBO J.*, **9**, 4511–4517.
48. *Zopf, D., Bernstein, H.D., Walter, P.* (1993) *J. Cell Biol.*, **120**, 1113–1121.
49. *Gowda, K., Black, S.D., Moeller, I., Sakakibara, Y., Liu, M.C., Zwieb, C.* (1998) *Gene*, **207**, 197–207.
50. *Krieg, U.C., Walter, P., Johnson, A.E.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8604–8608.
51. *Romisch, K., Webb, J., Lingelbach, K., Gausepohl, H., Dobberstein, B.* (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 1793–1802.
52. *High, S., Dobberstein, B.* (1991) *J. Cell Biol.*, **113**, 229–233.
53. *Gowda, K., Chittenden, K., Zwieb, C.* (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 388–394.
54. *Clemons, W.M.Jr., Gowda, K., Black, S.D., Zwieb, C., Ramakrishnan, V.* (1999) *J. Mol. Biol.*, **292**, 697–705.

55. Huang, Q., Abdulrahman, S., Yin, J., Zwieb, C. (2002) *Biochemistry*, **41**, 11362–11371.
56. Pool, M.R., Stumm, J., Fulga, T.A., Sinning, I., Dobberstein, B. (2002) *Science*, **297**, 1345–1348.
57. Rosendal, K.R., Wild, K., Montoya, G., Sinning, I. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14701–14706.
58. Kuglstatter, A., Oubridge, C., Nagai, K. (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 740–744.
59. Halic, M., Becker, T., Pool, M.R., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Frank, J., Beckmann, R. (2004) *Nature*, **427**, 808–814.
60. Beckmann, R., Spahn, C.M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P.A., Sali, A., Frank, J., Blobel, G. (2001) *Cell*, **107**, 361–372.
61. Halic, M., Beckmann, R. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 116–125.
62. Jacobson, M.R., Pederson, T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7981–7986.
63. Politz, J.C., Lewandowski, L.B., Pederson, T. (2002) *J. Cell Biol.*, **159**, 411–418.
64. Politz, J.C., Yarovoi, S., Kilroy, S.M., Gowda, K., Zwieb, C., Pederson, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 55–60.
65. Young, J.C., Ursini, J., Legate, K.R., Miller, J.D., Walter, P., Andrews, D.W. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 15650–15657.
66. Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M., Walter, P. (2001) *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 755–775.
67. Shan, S.O., Walter, P. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 921–926.
68. Miller, J.D., Tajima, S., Lauffer, L., Walter, P. (1995) *J. Cell Biol.*, **128**, 273–282.
69. Bacher, G., Pool, M., Dobberstein, B. (1999) *J. Cell Biol.*, **146**, 723–730.
70. Legate, K.R., Falcone, D., Andrews, D.W. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 27439–27446.
71. Schlenker, O., Hendricks, A., Sinning, I., Wild, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 8898–906.
72. Sprang, S.R. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 849–56.
73. Schwartz, T.U., Schmidt, D., Brohawn, S.G., Blobel, G. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6823–6828.
74. Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M.R., Sinning, I., Beckmann, R. (2006) *Science*, **312**, 745–747.
75. Walter, P., Ibrahimi, I., Blobel, G. (1981) *J. Cell Biol.*, **91**, 545–550.
76. Walter, P., Blobel, G. (1981) *J. Cell Biol.*, **91**, 551–556.
77. Walter, P., Blobel, G. (1981) *J. Cell Biol.*, **91**, 557–561.
78. Meyer, D.I., Krause, E., Dobberstein, B. (1982) *Nature*, **297**, 647–650.
79. Gilmore, R., Blobel, G., Walter, P. (1982) *J. Cell Biol.*, **95**, 463–469.
80. Gilmore, R., Walter, P., Blobel, G. (1982) *J. Cell Biol.*, **95**, 470–477.
81. Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V.L., Walter, P. (1986) *J. Cell Biol.*, **103**, 1167–1178.
82. Walter, P., Blobel, G. (1983) *J. Cell Biol.*, **97**, 1693–1699.
83. Anderson, D.J., Walter, P., Blobel, G. (1982) *J. Cell Biol.*, **93**, 501–506.
84. Bassuner, R., Wobus, U., Rapoport, T.A. (1984) *FEBS Lett.*, **166**, 314–320.
85. Bonatti, S., Migliaccio, G., Blobel, G., Walter, P. (1984) *Eur. J. Biochem.*, **140**, 499–502.
86. Sakaguchi, M., Mihara, K., Sato, R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3361–3364.
87. Anderson, D.J., Mostov, K.E., Blobel, G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7249–7253.



88. *Wiedmann, M., Huth, A., Rapoport, T.A.* (1984) *Nature*, **309**, 637–639.
89. *Garcia, P.D., Walter, P.* (1988) *J. Cell Biol.*, **106**, 1043–1048.
90. *Gundelfinger, E.D., Krause, E., Melli, M., Dobberstein, B.* (1983) *Nucleic Acids Res.*, **11**, 7363–7374.
91. *Siegel, V., Walter, P.* (1985) *J. Cell Biol.*, **100**, 1913–1921.
92. *Thomas, Y., Bui, N., Strub, K.* (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1920–1929.
93. *Bovia, F., Fornallaz, M., Leffers, H., Strub, K.* (1995) *Mol. Biol. Cell.*, **6**, 471–484.
94. *Hsu, K., Chang, D.Y., Marais, R.J.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 10179–10186.
95. *Bovia, F., Wolff, N., Ryser, S., Strub, K.* (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 318–326.
96. *Siegel, V., Walter, P.* (1988) *Cell*, **52**, 39–49.
97. *Lutcke, H., High, S., Romisch, K., Ashford, A.J., Dobberstein, B.* (1992) *EMBO J.*, **11**, 1543–1551.
98. *Hann, B.C., Poritz, M.A., Walter, P.* (1989) *J. Cell Biol.*, **109**, 3223–3230.
99. *Meyer, D.I.* (1985) *EMBO J.*, **4**, 2031–2033.
100. *Ibrahimi, I.* (1987) *J. Cell Biol.*, **104**, 61–66.
101. *Lipp, J., Dobberstein, B., Haeuptle, M.T.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 1680–1684.
102. *Okun, M.M., Shields, D.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 11476–11482.
103. *Wolin, S.L., Walter, P.* (1988) *EMBO J.*, **7**, 3559–3569.
104. *Wolin, S.L., Walter, P.* (1989) *J. Cell Biol.*, **109**, 2617–2622.
105. *Ainger, K.J., Meyer, D.I.* (1986) *EMBO J.*, **5**, 951–955.
106. *Siegel, V., Walter, P.* (1988) *EMBO J.*, **7**, 1769–1775.
107. *Wiedmann, M., Kurzchalia, T.V., Bielka, H., Rapoport, T.A.* (1987) *J. Cell Biol.*, **104**, 201–208.
108. *Sanz, P., Meyer, D.I.* (1988) *EMBO J.*, **7**, 3553–3557.
109. *Gilmore, R., Blobel, G.* (1983) *Cell*, **35**, 677–685.
110. *Connolly, T., Gilmore, R.* (1989) *Cell*, **57**, 599–610.
111. *Connolly, T., Rapiejko, P.J., Gilmore, R.* (1991) *Science*, **252**, 1171–1173.
112. *Bernstein, H.D., Poritz, M.A., Strub, K., Hoben, P.J., Brenner, S., Walter, P.* (1989) *Nature*, **340**, 482–486.
113. *Rapiejko, P.J., Gilmore, R.* (1992) *J. Cell Biol.*, **117**, 493–503.
114. *Bacher, G., Lutcke, H., Jungnickel, B., Rapoport, T.A., Dobberstein, B.* (1996) *Nature*, **381**, 248–251.
115. *Connolly, T., Gilmore, R.* (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 799–807.
116. *Miller, J.D., Wilhelm, H., Gierasch, L., Gilmore, R., Walter, P.* (1993) *Nature*, **366**, 351–354.
117. *Rapiejko, P.J., Gilmore, R.* (1994) *Mol. Biol. Cell.*, **5**, 887–897.
118. *Althoff, S.M., Stevens, S.W., Wise, J.A.* (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**, 7839–7854.
119. *Rapiejko, P.J., Gilmore, R.* (1997) *Cell*, **89**, 703–713.
120. *Mandon, E.C., Jiang, Y., Gilmore, R.* (2003) *J. Cell Biol.*, **162**, 575–585.
121. *Fulga, T.A., Sinning, I., Dobberstein, B., Pool, M.R.* (2001) *EMBO J.*, **20**, 2338–2347.
122. *Song, W., Raden, D., Mandon, E.C., Gilmore, R.* (2000) *Cell*, **100**, 333–343.
123. *Poritz, M.A., Siegel, V., Hansen, W., Walter, P.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4315–4319.
124. *Hann, B.C., Walter, P.* (1991) *Cell*, **67**, 131–144.

125. Felici, F., Cesareni, G., Hughes, J.M. (1989) *Mol. Cell Biol.*, **9**, 3260–3268.
126. Van Nues, R.W., Brown, J.D. (2004) *RNA*, **10**, 75–89.
127. Zwieb, C., van Nues, R.W., Rosenblad, M.A., Brown, J.D., Samuelsson, T. (2005) *RNA*, **11**, 7–13.
128. Strub, K., Fornallaz, M., Bui, N. (1999) *RNA*, **5**, 1333–1347.
129. Rosenblad, M.A., Zwieb, C., Samuelsson, T. (2004) *BMC Genomics*, **5**, 5.
130. Stirling, C.J., Hewitt, E.W. (1992) *Nature*, **356**, 534–537.
131. Regnacq, M., Hewitt, E., Allen, J., Rosamond, J., Stirling, C.J. (1998) *Mol. Microbiol.*, **29**, 753–762.
132. Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E., Simos, G. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 745–762.
133. Ciuffo, L.F., Brown, J.D. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 1256–1264.
134. Ogg, S.C., Poritz, M.A., Walter, P. (1992) *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 895–911.
135. Ogg, S.C., Barz, W.P., Walter, P. (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 341–354.
136. Schwartz, T., Blobel, G. (2003) *Cell*, **112**, 793–803.
137. Ng, D.T., Brown, J.D., Walter, P. (1996) *J. Cell Biol.*, **134**, 269–278.
138. Rothe, C., Lehle, L. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **252**, 16–24.
139. Zheng, N., Gierasch, L.M. (1996) *Cell*, **86**, 849–852.
140. Helmers, J., Schmidt, D., Glavy, J.S., Blobel, G., Schwartz, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 23686–23690.
141. Hann, B.C., Stirling, C.J., Walter, P. (1992) *Nature*, **356**, 532–533.
142. Ogg, S.C., Walter, P. (1995) *Cell*, **81**, 1075–1084.
143. Mutka, S.C., Walter, P. (2001) *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 577–588.
144. Arnold, C.E., Wittrup, K.D. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 30412–30418.
145. Keenan, R.J., Freymann, D.M., Walter, P., Stroud, R.M. (1998) *Cell*, **94**, 181–191.
146. Freymann, D.M., Keenan, R.J., Stroud, R.M., Walter, P. (1997) *Nature*, **385**, 361–364.
147. Lentzen, G., Moine, H., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Wintermeyer, W. (1996) *RNA*, **2**, 244–253.
148. Schmitz, U., James, T.L., Lukavsky, P., Walter, P. (1999) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 634–638.
149. Schmitz, U., Behrens, S., Freymann, D.M., Keenan, R.J., Lukavsky, P., Walter, P., James, T.L. (1999) *RNA*, **5**, 1419–1429.
150. Batey, R.T., Doudna, J.A. (2002) *Biochemistry*, **41**, 11703–11710.
151. Jovine, L., Hainzl, T., Oubridge, C., Scott, W.G., Li, J., Sixma, T.K., Wonacott, A., Skarzynski, T., Nagai, K. (2000) *Structure*, **8**, 527–540.
152. Batey, R.T., Rambo, R.P., Lucast, L., Rha, B., Doudna, J.A. (2000) *Science*, **287**, 1232–1239.
153. Montoya, G., Svensson, C., Luirink, J., Sinning, I. (1997) *Proteins*, **28**, 285–288.
154. Montoya, G., Svensson, C., Luirink, J., Sinning, I. (1997) *Nature*, **385**, 365–368.
155. Wood, H., Luirink, J., Tollervey, D. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5919–5925.
156. Focia, P.J., Shepotinovskaya, I.V., Seidler, J.A., Freymann, D.M. (2004) *Science*, **303**, 373–377.
157. Egea, P.F., Shan, S.O., Napetschnig, J., Savage, D.F., Walter, P., Stroud, R.M. (2004) *Nature*, **427**, 215–221.

158. *Lentzen, G., Dobberstein, B., Wintermeyer, W.* (1994) FEBS Lett., **348**, 233–238.
159. *Schaffitzel, C., Oswald, M., Berger, I., Ishikawa, T., Abrahams, J.P., Koerten, H.K., Koning, R.I., Ban, N.* (2006) Nature, **444**, 503–506.
160. *Halic, M., Blau, M., Becker, T., Mielke, T., Pool, M.R., Wild, K., Sinning, I., Beckmann, R.* (2006) Nature, **444**, 507–511.
161. *Rinke-Appel, J., Osswald, M., von Knoblauch, K., Mueller, F., Brimacombe, R., Sergiev, P., Avdeeva, O., Bogdanov, A., Dontsova, O.* (2002) RNA, **8**, 612–625.
162. *Buskiewicz, I., Kubarenko, A., Peske, F., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W.* (2005) RNA, **11**, 947–957.
163. *Zheng, N., Gierasch, L.M.* (1997) Mol. Cell., **1**, 79–87.
164. *Cleverley, R.M., Zheng, N., Gierasch, L.M.* (2001) J. Biol. Chem., **276**, 19327–19331.
165. *Luirink, J., High, S., Wood, H., Giner, A., Tollervey, D., Dobberstein, B.* (1992) Nature, **359**, 741–743.
166. *Cleverley, R.M., Gierasch, L.M.* (2002) J. Biol. Chem., **277**, 46763–46768.
167. *Valent, Q.A., Kendall, D.A., High, S., Kusters, R., Oudega, B., Luirink, J.* (1995) EMBO J., **14**, 5494–5505.
168. *Lee, H.C., Bernstein, H.D.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 3471–3476.
169. *Luirink, J., ten Hagen-Jongman, C.M., van der Weijden, C.C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B., Kusters, R.* (1994) EMBO J., **13**, 2289–2296.
170. *Zelazny, A., Seluanov, A., Cooper, A., Bibi, E.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 6025–6029.
171. *de Leeuw, E., Poland, D., Mol, O., Sinning, I., ten Hagen-Jongman, C.M., Oudega, B., Luirink, J.* (1997) FEBS Lett., **416**, 225–229.
172. *de Leeuw, E., te Kaat, K., Moser, C., Menestrina, G., Demel, R., de Kruijff, B., Oudega, B., Luirink, J., Sinning, I.* (2000) EMBO J., **19**, 531–541.
173. *Herskovits, A.A., Seluanov, A., Rajsbaum, R., ten Hagen-Jongman, C.M., Henrichs, T., Bochkareva, E.S., Phillips, G.J., Probst, F.J., Nakae, T., Ehrmann, M., Luirink, J., Bibi, E.* (2001) EMBO Rep., **2**, 1040–1046.
174. *Eitan, A., Bibi, E.* (2004) J. Bacteriol., **186**, 2492–2494.
175. *Phillips, G.J., Silhavy, T.J.* (1992) Nature, **359**, 744–746.
176. *Jensen, C.G., Brown, S., Pedersen, S.* (1994) J. Bacteriol., **176**, 2502–2506.
177. *Persson, B.C., Bylund, G.O., Berg, D.E., Wikstrom, P.M.* (1995) J. Bacteriol., **177**, 5554–5560.
178. *Seluanov, A., Bibi, E.* (1997) J. Biol. Chem., **272**, 2053–2055.
179. *Newitt, J.A., Ulbrandt, N.D., Bernstein, H.D.* (1999) J. Bacteriol., **181**, 4561–4567.
180. *de Gier, J.W., Mansournia, P., Valent, Q.A., Phillips, G.J., Luirink, J., von Heijne, G.* (1996) FEBS Lett., **399**, 307–309.
181. *Ulbrandt, N.D., Newitt, J.A., Bernstein, H.D.* (1997) Cell, **88**, 187–196.
182. *Ibrahimi, I., Fuchs, E.* (1987) J. Bacteriol., **169**, 1603–1610.
183. *Bernstein, H.D., Zopf, D., Freymann, D.M., Walter, P.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 5229–5233.
184. *Powers, T., Walter, P.* (1997) EMBO J., **16**, 4880–4886.
185. *Patel, S., Austen, B.M.* (1996) Eur. J. Biochem., **238**, 760–768.

186. *Chu, F., Shan, S.O., Moustakas, D.T., Alber, F., Egea, P.F., Stroud, R.M., Walter, P., Burlingame, A.L.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16454–16459.
187. *Powers, T., Walter, P.* (1995) *Science*, **269**, 1422–1424.
188. *Moser, C., Mol, O., Goody, R.S., Sinning, I.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11339–11344.
189. *Jagath, J.R., Rodnina, M.V., Lentzen, G., Wintermeyer, W.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 15408–15413.
190. *Jagath, J.R., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W.* (2000) *J. Mol. Biol.*, **295**, 745–753.
191. *Shan, S.O., Walter, P.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4480–4485.
192. *Jagath, J.R., Matassova, N.B., de Leeuw, E., Warnecke, J.M., Lentzen, G., Rodnina, M.V., Luirink, J., Wintermeyer, W.* (2001) *RNA*, **7**, 293–301.
193. *Peluso, P., Herschlag, D., Nock, S., Freymann, D.M., Johnson, A.E., Walter, P.* (2000) *Science*, **288**, 1640–1643.
194. *Peluso, P., Shan, S.O., Nock, S., Herschlag, D., Walter, P.* (2001) *Biochemistry*, **40**, 15224–15233.
195. *Spangord, R.J., Siu, F., Ke, A., Doudna, J.A.* (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1116–1122.
196. *Angelini, S., Deitermann, S., Koch, H.G.* (2005) *EMBO Rep.*, **6**, 476–481.
197. *Valent, Q.A., Scotti, P.A., High, S., de Gier, J.W., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B., Luirink, J.* (1998) *EMBO J.*, **17**, 2504–2512.
198. *Qi, H.Y., Bernstein, H.D.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 8993–8997.
199. *Scotti, P.A., Valent, Q.A., Manting, E.H., Urbanus, M.L., Driessen, A.J., Oudega, B., Luirink, J.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 29883–29888.
200. *Neumann-Haefelin, C., Schafer, U., Muller, M., Koch, H.G.* (2000) *EMBO J.*, **19**, 6419–6426.
201. *Jensen, C.G., Pedersen, S.* (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 7148–7154.
202. *Shibata, T., Fujii, Y., Nakamura, Y., Nakamura, K., Yamane, K.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 13162–13168.
203. *Suzuma, S., Hayashi, K., Nakamura, K., Yamane, K.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.*, **180**, 271–277.
204. *Sagar, M.B., Lucast, L., Doudna, J.A.* (2004) *RNA*, **10**, 772–778.
205. *Nakamura, K., Fujii, Y., Shibata, T., Yamane, K.* (1999) *Eur. J. Biochem.*, **259**, 543–550.