

РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ SM-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ: СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ СТРУКТУР И ФУНКЦИЙ

©2011 г. В. Н. МУРИНА, А. Д. НИКУЛИН

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Структура и функция бактериальных Sm-подобных белков Hfq. III. Sm-подобные белки архей. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

РНК-связывающие белки играют важную роль во многих процессах метаболизма РНК, таких как сплайсинг и процессинг РНК, регуляция транскрипции ДНК и трансляции РНК, и многих других. Среди большого количества разнообразных РНК-связывающих белков отдельную нишу занимают так называемые «РНК-шапероны», которые получили это название за способность помогать молекулам РНК приобретать правильную, нативную пространственную структуру [1]. Они не просто связываются с РНК, но обладают способностью менять (плавить) вторичную структуру молекул, таким образом способствуя возникновению необходимых внутримолекулярных контактов между отдельными участками РНК для правильного сворачивания. Кроме того, такие белки часто несут дополнительную функцию помощника при взаимодействиях различных РНК или белков с РНК. Представителями этого класса РНК-связывающих белков являются Sm и Sm-подобные белки (Lsm – Sm Like) [2]. Присутствие этих белков как в бактериях, так и в археях и эукариотах подчеркивает их биологическую значимость [3–6].

История изучения Lsm белков началась в 1959 году, когда у 22 летней Стефании Смит (Stephanie Smith) удалось установить причину

Принятые сокращения: Lsm – Sm-подобные белки; мяРНК – малые ядерные РНК; sRNA – малые регуляторные РНК; H-NS – гистоноподобный структурирующий белок нуклеоида; Kd – кажущаяся константа диссоциации.

Адрес для корреспонденции: nikulin@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Министерством науки и образования РФ (ГК № 02.740.11.0295).

сложного аутоиммунного заболевания – системной красной волчанки. Оказалось, что в ходе развития болезни организм больного продуцирует антитела к антигенам, которые представляют собой рибонуклеопротеин (РНП), названный «smith antigen» или Sm [7]. Позже было установлено, что Sm-антиген включает шесть малых ядерных РНК (мяРНК) – U1a, U1b, U2, U4, U5, U6 [8] и до 40 различных белков [9]. Эти РНП также были названы малыми ядерными или мяРНП. Белки мяРНП были разделены на две группы. В первую группу включили белки, специфичные для каждого индивидуального мяРНП, во вторую – остальные, которые оказались сходными по своей первичной структуре. Они были названы «Sm белками» [10]. Sm белки присутствуют в каждой частице мяРНП и необходимы для их биогенеза. В клетках мяРНП имеют различные функции: по всей видимости они являются важными модуляторами функционирования РНК [11], а также существенными компонентами эукариотических сплайсосом [12, 13]. Позже гомологичные Sm-подобные белки были найдены в археях и обнаружена гомология между эукариотическими Sm белками и бактериальными белками Hfq. В настоящее время эти белки все чаще привлекают внимание исследователей своей вовлеченностью во многие процессы, протекающие в клетках бактерий и архей. Данный обзор посвящен структурным аспектам организации бактериальных и архейных Sm-подобных белков, а также их взаимодействиям с различными молекулами РНК.

II. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ SM-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ HFQ

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ HFQ

Белок Hfq был открыт в 1968 г. как клеточный белок *E. coli* HF-I (Host factor I), принимающий участие в репликативном цикле бактериофага Q β *in vivo* [14, 15]. Немного позже был определен молекулярный вес белка – около 12,5 кДа, установлено, что активной формой белка является его гексамер, определена стехиометрия 1:1 связывания гексамера белка HF-I и РНК, использована методика прогрева до 85°C для очистки белка HF-I от клеточных белков [16]. В 1991 г. был идентифицирован и клонирован ген *hfq* из *E. coli*, кодирующий белок HF-I, определена его последовательность, установлено, что этот ген кодирует белок длиной 102 аминокислотных остатка [17]. В более поздних опытах *in vitro* было показано, что Hfq плавит 3'-конец «+» цепи фаговой РНК, обеспечивая взаимодействие

Q β -репликазы с этим районом РНК и начало синтеза « \leftarrow » цепи [18]. В неинфицированных бактериальных клетках Hfq является полифункциональным регулятором трансляции большого числа мРНК, включая мРНК белков репарации ДНК [19].

Сравнение аминокислотных последовательностей белков Hfq (рис. 1) показало, что они имеют выраженную консервативную центральную область примерно в 80 аминокислотных остатков и переменную С-концевую часть переменной длины [20]. В белках Hfq было обнаружено наличие консервативного мотива Sm1, характерного для Sm белков эукариот [10], и, таким образом, выявлена гомология между бактериальными белками Hfq и эукариотическими Sm/Lsm белками [20, 21]. Это позволило предположить, что бактериальные белки Hfq и эукариотические белки Sm/Lsm имеют общего предка [22].

Наиболее консервативной частью белков Hfq является мотив Sm2, располагающийся на конце β 4 и начале β 5 тяжей, и захватывающий короткую перетяжку между ними (рис. 1). Он включает в себя консенсус [Y/F]KNAI, который сохраняется практически во всех бактериальных белках. Аминокислотные остатки Sm2 мотива участвуют во взаимодействии белка с РНК [23], и, по всей вероятности, определяют четвертичную структуру белка и его высокую термостабильность [24–26].

Поиск гомологов Hfq среди известных на 2002 г. геномов бактерий давал положительные результаты только для примерно половины из них [22]. Поскольку гомологи белка не были найдены в некоторых протеобактериях и грамположительных бактериях, возникло предположение, что для некоторых ветвей эволюции ген белка был потерян [22]. Однако позже, благодаря применению более совершенных алгоритмов поиска гомологов в сочетании с использованием аминокислотных паттернов, ортологи белка Hfq были обнаружены ещё в ряде геномов, в которых ранее они не были идентифицированы [6]. Эти данные позволили заключить, что белки Hfq распространены значительно шире, чем предполагалось ранее, и что они могут иметь значительные вариации по первичной структуре.

Одним из ярких примеров отдаленных ортологов Hfq являются белки из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Anabaena* PCC 7120, которые были выделены в новую группу белков Hfq [27]. У представителей этой группы обнаружено 65% сходство по первичной структуре при 30% идентичности аминокислотных остатков между собой. Выделение их в отдельную группу подтверждается при сравнении с другими белками Hfq (рис. 1). В частности, консервативная область Sm2 мотива у белков из цианобактерий отличается от кон-

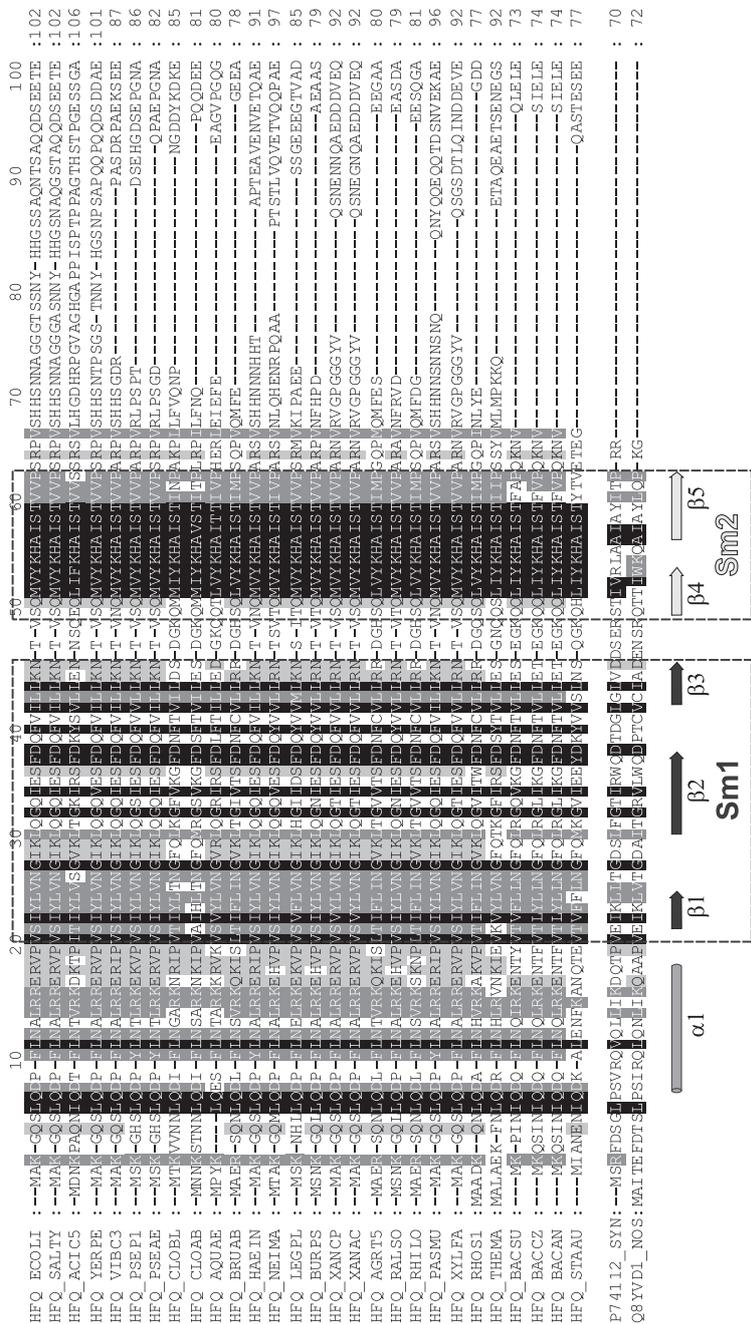


Рис. 1. Подпись см. сл. стр.

Рис.1. Сравнение аминокислотных последовательностей некоторых белков Hfq: *Escherichia coli* (HFQ_ECOLI), *Salmonella typhimurium* (HFQ_SALTY), *Acidobacterium capsulatum* (HFQ_ACIC5), *Yersinia pestis* (HFQ_YERPE), *Vibrio cholerae* serotype O1 (HFQ_VIBC3), *Pseudomonas putida* (HFQ_PSEP1), *Pseudomonas aeruginosa* (HFQ_PSEAE), *Clostridium botulinum* (HFQ_CLOBL), *Clostridium acetobutylicum* (HFQ_CLOAB), *Aquifex aeolicus* (HFQ_AQUAE), *Brucella abortus* (HFQ_BRUAB), *Haemophilus influenzae* (HFQ_HAEIN), *Neisseria meningitidis* (HFQ_NEIMA), *Legionella pneumophila* (HFQ_LEGPL), *Burkholderia pseudomallei* (HFQ_BURPS), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (HFQ_XANCP), *Xanthomonas axonopodis* (HFQ_XANAC), *Agrobacterium tumefaciens* (HFQ_AGR5), *Ralstonia solanacearum* (HFQ_RALSO), *Rhizobium loti* (HFQ_RHILO), *Pasteurella multocida* (HFQ_PASMU), *Xylella fastidiosa* (HFQ_XYLFA), *Rhodobacter sphaeroides* (HFQ_RHOS1), *Thermotoga maritima* (HFQ_THEMA), *Bacillus subtilis* (HFQ_BACSU), *Bacillus cereus* (HFQ_BACCZ), *Bacillus anthracis* (HFQ_BACAN), *Staphylococcus aureus* (HFQ_STAAU), *Nostoc sp.* (Q8YVD1_NOS), *Synechocystis sp.* (P74112_SYN).

Цифры наверху соответствуют последовательности белка из *E. coli*. Выделение аминокислот в последовательностях черным цветом соответствует их идентичности (или консервативным заменам) по всем последовательностям бактериальных белков (за исключением цианобактерий *Nostoc sp.* и *Synechocystis sp.*), темно-серым цветом – идентичности не менее чем 80%, светло-серым – не менее чем 60%. Внизу показано соотнесение аминокислотных последовательностей со вторичной структурой белка, а также области консервативных мотивов Sm1 и Sm2. Сравнение последовательностей осуществлено в программе T-Coffee (<http://www.tcoffee.org/>), оформление – в программе Genedoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>).

сенсуса [Y/F]KHA1 и заменена на последовательность RLAA1 в белке из *Synechocystis* или на WKQA1 в белке из *Anabaena* [27]. Отличия в первичной структуре привели к тому, что белки Hfq из *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Anabaena* PCC 7120 имеют намного меньшее сродство к РНК, связывающимися с белком Hfq из *E. coli*. Они не могут регулировать экспрессию генов в клетках *E. coli in vivo* [27], однако нокаут гена *hfq* в *Synechocystis* приводит к потере подвижности клеток и значительно снижает уровень синтеза мРНК ряда генов [28], что позволяет говорить об этих белках, как глобальных регуляторах транскрипции.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА HFQ

Первые данные о структуре белка Hfq были получены с помощью электронной микроскопии [20]. На электронно-микроскопических изображениях видно, что белок образует высокосимметричные гексамеры диаметром около 70–80Å. Определение пространственных структур белка Hfq из *Staphylococcus aureus* [23], коровой части (1–72

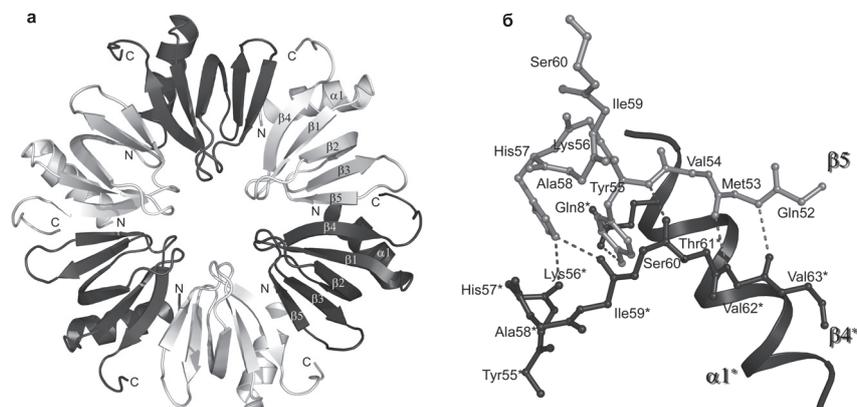


Рис. 2. Пространственная структура белка Hfq из *P. aeruginosa* (код PDB 1U1S).

а) Четвертичная структура белка – гексамер. Соседние мономеры выделены светло-серым и темно-серым оттенками. На двух мономерах белка указаны элементы вторичной структуры.

б) Область интерфейса двух соседних мономеров белка в гексамере. Показаны атомы главных цепей β_4 и β_5 тяжей, α -спираль одного мономера и боковые цепи остатков, образующие межмолекулярные водородные связи. Водородные связи изображены пунктирной линией. Номера аминокислотных остатков со звездочками и без звездочек относятся к соседним мономерам. Изображения пространственных структур здесь и далее созданы на основе координат атомов из банка данных RCSB (<http://www.rcsb.org/>) программой PyMol (<http://www.pymol.org/>).

остатки) белка из *E. coli* [24] и белка из *Pseudomonas aeruginosa* [26] подтвердило организацию белком Hfq четвертичной структуры в виде гексамера (рис. 2). Они представляют собой тороиды с внешним диаметром около 70 Å и центральной полостью диаметром 8–10 Å.

Формирование четвертичной структуры белка Hfq происходит за счет образования «сквозного» β -листа путем объединения β -тяжей соседних мономеров. Водородные связи, образуемые атомами главных цепей соседних β -тяжей, определяют ориентацию мономеров относительно друг друга в олигомере. Антипараллельные β -тяжи белка подразделяются на два консервативных мотива: Sm1 (тяжи β_1 , β_2 , β_3) и Sm2 (тяжи β_4 и β_5) [29]. Вместе они организуют структурный Sm-фолд, характерный для всех белков семейства Lsm. Структура Sm-фолда очень похожа на OB-фолд (**O**ligonucleotide **B**inding) [30] и обладает SH3-подобной топологией [31].

На N-конце молекулы белка Hfq находится α -спираль (для белка из *E. coli* – остатки с 7 по 18), которая присутствует во всех Sm/Lsm белках, но не относится к Sm-фолду. В гексамере α -спираль каждого

мономера располагается на одной стороне тороида и прикрывает межсубъединичный интерфейс от растворителя [32]. Эта сторона гексамера называется проксимальной, а противоположная – дистальной.

Вместе с N-концевой α -спиралью β -тяги Sm-фолда образуют коровую часть белка Hfq (остатки 7–66), которая наиболее консервативна среди всех известных белков Hfq [24]. Располагающаяся далее C-концевая часть белка имеет длину от 7 (в *Bacillus subtilis*) до 36 (в *E. coli*) преимущественно положительно заряженных остатков и не обладает выраженной гомологией среди известных последовательностей (рис. 1). По имеющимся данным, белок Hfq *E. coli*, укороченный с C-конца до 66–72 остатков продолжает сохранять способность образовывать гексамеры и связывать некоторые РНК [33, 34], однако такой белок менее компактен и стабилен [35]. Известно много природных укороченных белков Hfq, которые практически представляют собой только коровую часть молекулы белка, и в то же время успешно функционируют. К их числу можно отнести белки Hfq из *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Anabaena* PCC 7120 [27], *Aquifex aeolicus* [36], *Listeria monocytogenes* [37], а также единственный известный архейный белок Hfq из *Methanococcus jannaschii* [38].

Относительно функциональности белка Hfq *E. coli*, лишённого C-концевой области, имеются противоречивые данные. С одной стороны показано, что укороченный с C-конца до 65 остатков белок *E. coli* способен связывать некодирующие РНК и даже способствовать изменению их вторичных структур, однако он не способен связывать мРНК и осуществлять регуляцию экспрессии ряда генов *in vivo*, включая авторегуляцию экспрессии гена *hfq* [39]. С другой стороны приводятся данные о наличии негативного и позитивного контроля регуляции экспрессии ряда генов укороченными с C-конца до 65, 66, 69 и 72 остатков белка Hfq из *E. coli in vivo* [40]. Тем не менее, обе группы авторов согласны с тем, что укороченные варианты белка способны связываться с достаточно большим количеством различных молекул РНК, разногласия же возникают только лишь в отношении оценки сохранения способности к регуляции экспрессии ряда генов.

БЕЛОК HFQ КАК РЕГУЛЯТОР ТРАНСКРИПЦИИ

Как уже говорилось выше, белок Hfq является плейотропным многофункциональным пост-транскрипционным регулятором, который способен выступать в роли как положительного, так и отрицательного регулятора трансляции многих бактериальных мРНК [32, 41]. При связывании данного белка с мРНК происходит изменение ее вторичной структуры и, как следствие, изменение стабильности мРНК или

уровня ее трансляции [42–44]. Это может приводить к увеличению или уменьшению эффективности экспрессии более 40 генов во время стационарной фазы роста клеток *E. coli* [41, 45].

Белок Hfq также участвует во взаимодействии малых регуляторных РНК (sRNA) с мРНК [6, 41, 46], обеспечивая плавление вторичной структуры молекул РНК и способствуя их взаимодействию. В качестве наиболее изученных примеров можно привести регуляцию трансляции *galK* мРНК (кодирует галоктокиназу) с участием Spot42 sRNA [47], *fhfA* мРНК (кодирует ДНК-связывающий транскрипционный активатор FhlA) с участием OxyS sRNA [48, 49], репрессию трансляции *hns* мРНК (кодирует нуклеод-ассоциированный белок H-NS) регуляторной DsrA sRNA [44], репрессию трансляции *rpoS* мРНК (кодирует σ^s субъединицу бактериальной РНК-полимеразы) OxyS sRNA [50, 51] и стимуляцию трансляции *rpoS* мРНК с участием DsrA sRNA [42, 52–54].

Ген *rpoS* кодирует σ^s субъединицу бактериальной РНК-полимеразы [55, 56], которая, в свою очередь, является регулятором экспрессии многих генов в процессе роста клеток [57], регулирует экспрессию генов белков, необходимых при стрессовых условиях [58–62], а также синтез факторов вирулентности некоторых патогенных видов бактерий, таких как *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* и других [5, 63–67]. Экспрессия гена *rpoS* контролируется на уровнях транскрипции, трансляции и стабильности белка [68]. Среди белков-регуляторов трансляции гена *rpoS* известны белки H-NS [69] и Hfq [70], а также две регуляторных sRNA: OxyS [50] и DsrA [53]. Общая схема регуляции трансляции σ^s показывает зависимость этого процесса от ряда внешних и внутренних факторов.

Hfq представляет собой ключевой белок, обеспечивающий эффективную трансляцию σ^s субъединицы. У клеток *E. coli* с инактивированным геном *hfq* при входе в стационарную фазу роста наблюдается понижение скорости роста, уменьшение длины клеток, повышение осмочувствительности и чувствительности к УФ облучению [33]. Клетки с таким генотипом по своим фенотипическим признакам во многом напоминают клетки с инактивированным геном *rpoS*, у которых отсутствие транскрипционного фактора σ^s приводит к неспособности эффективно адаптироваться к жестким условиям стационарной фазы роста. Важность роли Hfq подчеркивается тем фактом, что инактивация его гена оказывается эпистатичной по отношению к инактивации генов остальных факторов, участвующих в регуляции экспрессии σ^s субъединицы. Таким образом, подавление активности гена *hfq* приводит к утрате механизма регуляции экспрес-

сии σ^s с помощью белка H-NS, OxyS РНК, DsrA РНК и некоторых внешних факторов [42, 57].

Функция, выполняемая белком Hfq при стимулировании процесса инициации трансляции *rpoS* мРНК, как и в случае с Q_{β} РНК, заключается в изменении структуры РНК. Белок Hfq может связываться с областью инициации трансляции *rpoS* мРНК, изменять ее вторичную структуру и, таким образом, обеспечивать процесс узнавания этой области 30S субчастицей рибосомы [55].

Функциональная активность и уровень транскрипции Hfq контролируется гистоноподобным структурирующим белком нуклеоида H-NS (**h**istone-like **n**ucleoid **s**tructuring protein). Он представляет собой термостабильный ДНК-связывающий белок, регулятор экспрессии большого числа генов *E. coli*. H-NS выступает в качестве репрессора транскрипции гена *hfq* [55], но, кроме этого, может непосредственно связываться с белком Hfq и инактивировать его [17]. Дополнительно экспрессия гена *hfq* авторегулируется на уровне трансляции. 5'-НТО *hfq* мРНК имеет две шпильки, связывание с которыми белка Hfq приводит к ингибированию образования инициаторного трансляционного комплекса. В опытах *in vitro* и *in vivo* было показано, что только одновременное связывание белка с обеими шпильками приводит к эффективной репрессии трансляции *hfq* мРНК [71].

Белки Hfq и H-NS взаимодействуют с пост-транскрипционным регулятором DsrA. Эта РНК длиной 87 нуклеотидов принимает участие в регуляции экспрессии генов *hns* и *rpoS*, кодирующих соответственно белки H-NS и σ^s субъединицу РНК-полимеразы [52]. DsrA блокирует инициацию трансляции H-NS, связываясь с областью *hns* мРНК, расположенной непосредственно после стартового АТГ кодона. При этом в клетке происходит инактивация синтеза белка H-NS, повышение уровня экспрессии гена *hfq* и, как следствие, – активация трансляции *rpoS* мРНК. С другой стороны, DsrA может напрямую выступать положительным регулятором экспрессии гена *rpoS*. При низких температурах трансляция *rpoS* мРНК блокируется из-за того, что его 5'-НТО и рибосом-связывающий участок RBS (**r**ibosome **b**inding **s**ite) мРНК образует стабильную вторичную структуру. DsrA связывается с этим участком мРНК и освобождает участок посадки рибосом для инициации трансляции [45]. По имеющимся данным, DsrA проявляет свою активность по плавлению вторичных структур RBS *rpoS* мРНК только в комплексе с белком Hfq [44].

Число молекул Hfq, способных стимулировать инициацию трансляции *rpoS* мРНК, может определяться регуляторной sRNA OxyS длиной 102 нуклеотида, которая специфически связывается со

свободным белком Hfq и не допускает его ассоциации с другими РНК. Белок Hfq, связанный с OxyS, не может быть положительным фактором инициации трансляции транскрипционного фактора σ^S . Таким образом, OxyS контролирует экспрессию всех генов, находящихся под контролем σ^S субъединицы РНК полимеразы [50].

HFQ – РЕГУЛЯТОР СТАБИЛЬНОСТИ НЕКОТОРЫХ мРНК

Изменение стабильности мРНК является одним из способов контроля экспрессии генов, который позволяет клетке быстро адаптироваться к меняющимся условиям среды. Стабильность единичных транскриптов или совокупности мРНК может определяться воздействием антибиотиков, нарушением питания, переходом из одной фазы роста в другую, а также при изменении скорости роста. В распаде и процессинге мРНК у *E. coli* принимают участие сайт-специфические эндорибонуклеазы, экзорибонуклеазы и поли(А)-полимераза [72].

Одним из механизмов, обеспечивающих контролируемый уровень деградации тех или иных транскриптов, является наращивание поли(А) последовательности до определенной длины на 3'-конце мРНК с помощью поли(А)-полимеразы PAP I. Уменьшение стабильности полиаденилированной мРНК связывают с ее большей доступностью действию рибонуклеазы E, которая связывается с поли(А) хвостом на 3'-конце мРНК, что облегчает ее взаимодействие с внутренними специфическими сайтами узнавания на мРНК [73].

Белок Hfq может участвовать в этих процессах на двух стадиях. Во-первых, он эффективно связывается с А-богатыми участками мРНК и повышает активность фермента PAP I, что приводит к удлинению 3'-поли(А) и дестабилизации мРНК *in vivo*. Механизм действия Hfq до конца не изучен, однако установлено, что сначала белок связывается с небольшим поли(А)-хвостом мРНК длиной 10–15 нуклеотидов, а затем делает его более доступным для контакта с PAP I. При этом Hfq увеличивает процессивность фермента PAP I, обеспечивая достройку поли(А). Во-вторых, белок Hfq может защищать сайты узнавания таких РНКаз как полинуклеотидфосфорилаза, РНКазы E и РНКазы II, от связывания с ними. Обычно это 3'-поли(А) участки и 5' AU-богатые НТО. Ярким примером такой защиты от действия РНКаз белком Hfq является мРНК *rpsO*, которая кодирует рибосомный белок S15 [74].

Еще одним примером регуляции стабильности мРНК с участием белка Hfq является регуляция трансляции *ftsZ* мРНК, продукт трансляции которой, белок FtsZ, принимает непосредственное участие в делении клетки. Избыток FtsZ приводит к продукции миниклеток, что использовалось для выявления роли Hfq в процессе регуляции

трансляции *FtsZ* [75]. Показано, что уровень белка *FtsZ* значительно повышается в стационарной фазе роста в мутантах с делетированным геном *hfq* вследствие чего происходит увеличение процентного содержания миниклеток. Вероятнее всего, механизм действия Hfq сводится к увеличению доступности сайтов узнавания для РНКазы E внутри *ftsZ* мРНК за счет преобразования вторичной структуры РНК.

Белок Hfq принимает участие в защите клетки от стрессовых условий, вызванных повышенной концентрацией гидроксил-радикалов во время стационарной фазы роста. Причиной стресса может быть усиленная экспрессия белков *FerA* и *FhuE*, отвечающих за ассимиляцию Fe^{2+} . В логарифмической фазе роста клетки активно накапливают ионы железа, необходимые для пролиферации. В стационарной фазе клетка не нуждается в таких количествах железа, и его ассимиляция блокируется повышенной концентрацией Hfq. Таким образом предотвращается индуцируемый избытком катионов Fe^{2+} стресс, приводящий к интенсивной реакции образования гидроксил-радикалов. Белок Hfq способен влиять на экспрессию генов *ferA* и *fhuE*, и, по-видимому, механизм его действия связан с регуляцией стабильности мРНК [76].

Hfq участвует в регуляции стабильности мРНК и по другому механизму – способствуя взаимодействию регуляторных РНК с мРНК. В качестве примера можно привести его участие в деградации *ompA* мРНК, отвечающей за синтез основного белка внешней мембраны клетки *OmpA*. Стабильность данного транскрипта зависит от скорости бактериального роста и определяется взаимодействием с рибонуклеазой E, которая расщепляет его 5'-НТО.

5'-НТО *ompA* мРНК состоит из двух шпилечных структур, граничащих с АУ-богатыми участками и обеспечивающих высокую устойчивость к действию рибонуклеазы. Первоначально считалось, что Hfq осуществляет локальное изменение вторичной структуры *ompA* мРНК: происходит открытие сайтов узнавания эндорибонуклеазы E и инициируется деградация мРНК. Действительно, стабильность *ompA* мРНК коррелирует с содержанием Hfq в клетке: чем больше белка, тем менее стабильна мРНК. Это происходит при замедлении скорости ростовых процессов, в частности, при входе в стационарную фазу роста [72]. Более подробные исследования *in vitro* показали, что механизм деградации более сложен и вторичные структуры РНК в виде шпилек сами по себе не могут служить защитой от действия рибонуклеазы E. Ключевую роль в стабилизации мРНК, по-видимому, играют связанные с 5'-НТО 30S субчастицы рибосом, которые закрывают РНКазные сайты узнавания. Было высказано

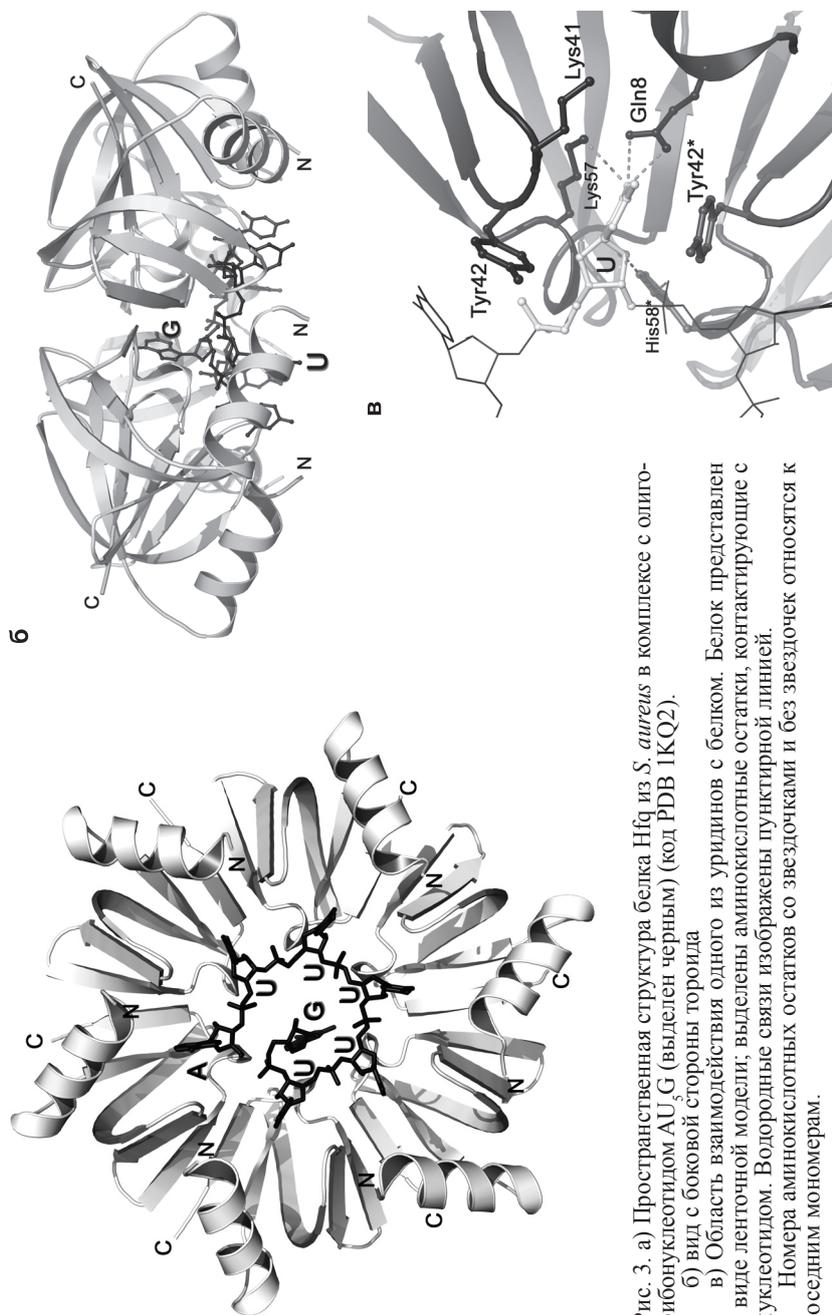
предположение, что Hfq выступает в качестве конкурента 30S рибосомных субчастиц и вытесняет их из нетранслируемой области, открывая, таким образом, сайты узнавания для РНКазы E [77].

Однако более поздние исследования показали, что даже такая схема не совсем верна. Была обнаружена малая регуляторная РНК *MicA*, посредством которой происходит регуляция деградации *ompA* мРНК, и сконструирован штамм $\Delta micA$ *E. coli*, в котором отсутствовал ген *micA*, но присутствовал ген *hfq* дикого типа [78]. Выяснилось, что такой штамм утрачивает способность к контролируемой экспрессии мРНК *ompA*. На основании этих данных была предложена новая модель, которая предполагает регуляцию стабильности *ompA* через конкурентное связывание *MicA* sRNA и иницирующих рибосом. В логарифмической фазе роста, когда *MicA* sRNA присутствует в клетке в небольшом количестве, рибосомы способны успешно связываться с инициаторным участком *ompA* мРНК, происходит нормальный синтез белка OmpA, а мРНК защищена от действия РНКазы E 30S рибосомными субчастицами. В стационарной фазе роста *MicA* sRNA накапливается в клетке и связывается с 5'-НТО *ompA* мРНК. Вероятно, на этом этапе Hfq стабилизирует *MicA* sRNA или способствует её связыванию с 5'-НТО *ompA* мРНК. Это приводит к удалению рибосомных субчастиц с *ompA* мРНК и прекращению синтеза белка OmpA. Вследствие отсутствия на мРНК рибосом 5'-НТО мРНК становится доступным для РНКазы E и происходит деградация мРНК [78]. В заключение следует упомянуть, что время жизни *hfq* мРНК также определяется присутствием белка Hfq совершенно аналогичным образом, как и в случае *ompA* мРНК [71].

ОБЛАСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ мРНК И РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК

Долгое время оставался неизвестным механизм взаимодействия молекул РНК с белком Hfq. Первые структурные данные по взаимодействию белка Hfq с РНК дала полученная в 2002 г. структура белка Hfq из *Staphylococcus aureus* в комплексе с рибоолигонуклеотидом AU₅G [23] (рис. 3). Нуклеотиды располагаются в области проксимального сайта гексамера; каждый из нуклеотидов связывается с аминокислотными остатками двух субъединиц гексамера. Исключение составляет 3'-гуанозин, который выходит в центральную полость гексамера белка и не образует специфических контактов с белком.

И 5'-аденозин, и все уридины связываются схожим образом. Основания нуклеотидов расположены между боковыми цепями Lys41 и Tyr42 двух соседних мономеров, с которыми образуют стэкинг. Атомы азота боковой цепи Lys57 связаны водородной связью с O2



атомом урацила, а боковые цепи остатков His58 взаимодействуют с фосфатной группой и O2' атомами рибозных колец. Неожиданным оказалось, что Gln8, который не принадлежит Sm-фолду, а находится в N-концевой α -спирали, образует водородные связи с урацилами. Несмотря на то, что авторы указывают на существовании прямых контактов концевых атомов азота Lys41 и карбоксильных атомов кислорода главной цепи с основаниями уридинов, это скорее носит случайный характер и наблюдается только в одном нуклеотиде из шести.

Анализ структуры комплекса показал, что расположение боковых цепей Gln8, Lis41 и Lis57 затрудняет связывание оснований цитидина и гуанозина, но дает предпочтение урацилам и допускает аденины. С другой стороны аминокислотные остатки Lys57 и His58, контактирующие с рибозой, определяют предпочтение в связывании РНК перед ДНК. Таким образом, структура комплекса Hfq-AU₅G дала ключ к пониманию принципов взаимодействия белка Hfq с короткими AU-богатыми одноцепочечными фрагментами РНК. Однако остается открытым до сих пор вопрос о том, как узнаются и связываются с белком длинные (более 100 нуклеотидов) мРНК [32].

ОБЛАСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ПОЛИ(А) РНК

В 1980 году было обнаружено, что Hfq связывается с поли(А) участками РНК, причем константа связывания зависит от длины этого участка и максимальной она является для фрагментов длиной от 15 до 27 нуклеотидов [79]. Также было показано, что остатки Tyr25, Phe30 и Lys31 белка Hfq из *E. coli* участвуют в связывании поли(А) РНК, поскольку их замена на аланин приводит к более чем стократному снижению сродства белка Hfq к поли(А) РНК [80, 81]. Эти остатки принадлежат дистальной поверхности гексамера, то есть противоположной месту связывания мРНК и регуляторных РНК. Это было подтверждено измерениями констант связывания РНК с мутантными формами белка. Замены Phe42Ala, Tyr55Ala, Lis56Ala, His57Ala в проксимальном сайте связывания РНК приводили только к небольшому снижению сродства поли(А) РНК к белку, но значительно уменьшало связывание DsrA и поли(У) РНК. Кроме того оказалось, что A₂₇ РНК не конкурирует с DsrA за связывание с белком Hfq, что также подтверждает наличие двух независимых сайтов связывания поли(А) РНК и регуляторных РНК [80].

Сопоставление этих результатов с данными стереохимического анализа и данными по распределению зарядов на поверхности Hfq из *E. coli*, дало основание для конструирования гипотетической

модели взаимодействия поли(А) с белком Hfq [32]. Согласно этой модели участок связывания поли(А) РНК является круговым и центросимметричным. На основании данных по влиянию замен аминокислотных остатков, в качестве основного места узнавания аденинов был идентифицирован гидрофобный карман, состоящий из аминокислотных остатков Tyr25, Ile30 и Leu32 и дополненный остатком Lys31 соседнего мономера.

В конце 2009 г. была определена структура Hfq из *E. coli* в комплексе с поли(А) РНК длиной 15 нуклеотидов [82] (рис. 4). Асимметричная ячейка кристалла содержит 3 субъединицы Hfq и 9 остатков аденина, контактирующих с белком. Область связывания и общее расположение поли(А) РНК совпадает с предложенной ранее моделью. Каждый мономер белка контактирует с триплетом аденинов, каждый триплет связывается с белком аналогичным образом в трех сайтах, которые были названы А, R и E.

Авторы этой работы предложили, что специфичность узнавания адениновых нуклеотидов белком Hfq обеспечивается в первую очередь А-сайтом, который находится в желобке между тяжами $\beta 2$ и $\beta 4$. Водородные связи азота и кислорода главной цепи Gln33 с N6 и N7 атомами аденозина обеспечивают его специфичное узнавание. Положение нуклеотида дополнительно стабилизируется атомами остатков Gln52, который образует водородную связь с атомом N1 аденозина, и, возможно, Asn48, который может образовывать контакт с атомом N6.

R-сайт находится в желобке, который сформирован β -тяжами соседних субъединиц белка. С одной стороны основание аденина окружают боковые цепи остатков Leu 26, Ile 30, Leu32, а с другой стороны основание плотно фиксируется боковой цепью Tyr25. Аденин образует две водородные связи с полярными атомами боковых цепей аминокислотных остатков Thr61 и Gln52. Положение боковой цепи Gln52 не мешает вхождению гуанина в R сайт, поскольку боковая цепь глутамина может легко развернуться и образовать контакт G(O4)–Gln52(NE). Интересно отметить наличие в данном сайте водородной связи O2' атома рибозы с атомом кислорода главной цепи белка (остаток Gly29). Вероятно, это определяет преимущество в связывании белка с РНК, а не с ДНК.

Основание нуклеотида в E-сайте не контактирует с атомами молекулы белка, а выходит в противоположную сторону и становится открытым для внешних контактов. Анализ структуры позволил предсказать предпочтение в связывании на дистальной поверхности белка Hfq последовательностям, соответствующим консенсусу (5'-ARN-3')_n,

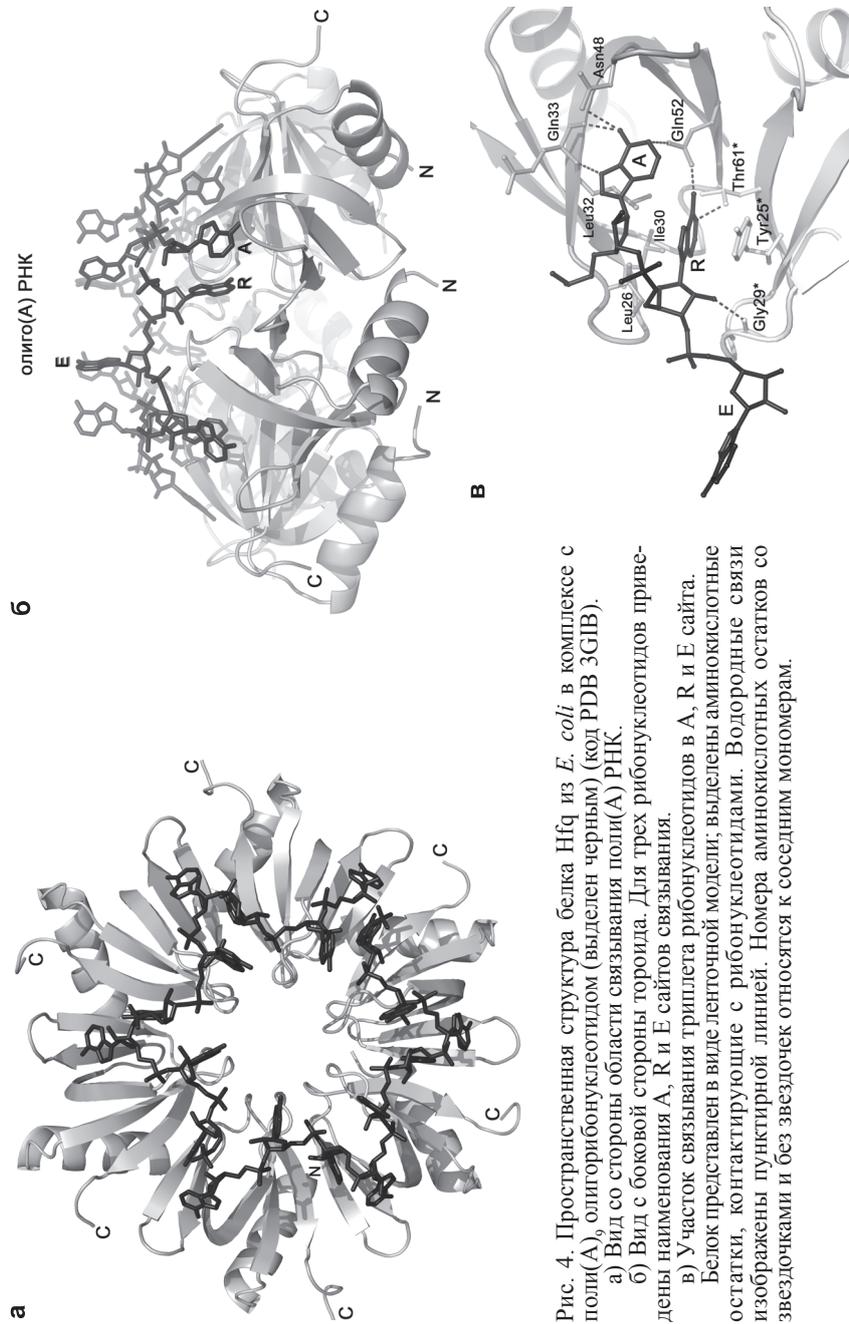


Рис. 4. Пространственная структура белка Nfq из *E. coli* в комплексе с поли(А), олигорибонуклеотидом (выделен черным) (код PDBV 3G1B).

а) Вид со стороны области связывания поли(А) РНК.

б) Вид с боковой стороны тороида. Для трех рибонуклеотидов приведены наименования А, Р и Е сайтов связывания.

в) Участок связывания триплета рибонуклеотидов в А, Р и Е сайта.

Белок представлен в виде ленточной модели; выделены аминокислотные остатки, контактирующие с рибонуклеотидами. Водородные связи изображены пунктирной линией. Номера аминокислотных остатков со звездочками и без звездочек относятся к соседним мономерам.

где А – аденин, R – аденин или гуанин, а N – любой нуклеотид, что подтвердили данные по связыванию – сродство белка Hfq к (AGG)₉ в 10 раз меньше, чем к (AAA)₉ [82].

Немного позже в банк данных пространственных структур макромолекул RCSB была депонирована (но статья с описанием и анализом структуры не опубликована до сих пор) структура белка YmaH (Hfq) из *Bacillus subtilis* в комплексе с олигорибонуклеотидом AGAGAGA (PDB ID 3HSB). В данном комплексе связывание фрагмента РНК происходит также с дистальной стороны белка, однако чередование аденина и гуанина в используемом фрагменте РНК не подходит под консенсус-триплет аденин–пурин–N. Оказалось, что данный олигорибонуклеотид связывается несколько иначе и основной единицей связывания является не триплет нуклеотидов AAA, а пара AG (рис. 5).

Все аденины этого комплекса связываются сходным образом: они располагаются в гидрофобном кармане, образованном остатками Leu25, Phe29 и Leu31 с одной стороны и Phe24 с другой стороны. Эти остатки являются аналогами Leu26, Phe30, Leu32 и Tyr25 белка Hfq из *E. coli*. Сохраняется водородная связь между N6 атомом аденина и Thr61, однако боковая цепь Gln52 находится далеко от основания и не контактирует с ним. Вместо этого возникают дополнительные водородные связи между атомами аденина N1 и боковой цепью Ser60, а в некоторых участках связывания – между атомами аденина N3 и боковой цепью Asn27. Положение рибозы аденинов аналогично их положению в комплексе поли(А) РНК с Hfq, и водородная связь O2' рибозы с атомом кислорода главной цепи Gly28 (аналог Gly29 в белке из Hfq из *E. coli*) также имеется. Таким образом, несмотря на некоторое перераспределение сетки водородных связей, сайт связывания аденина в белке Hfq из *B. subtilis* является аналогом R-сайта белка из *E. coli*.

Гуанины связываются в участке, располагающемся не в полости белка, а на его поверхности. Одна сторона основания полностью открыта растворителю, а другая расположена параллельно боковой цепи Gln30, находясь с ней в стэкинге. Единственный остаток белка, образующий с гуанином контакты – это Arg32 (аналог Gln33 в белке из *E. coli*), который своей концевой аминокислотной группой образует водородные связи с атомами O6 и N4 основания. Это место близко к А-сайту в комплексе Hfq *E. coli* с поли(А) РНК, но организовано совершенно другим образом. В результате в комплексе AGAGAGA РНК с белком Hfq из *B. subtilis* задействован только один сайт узнавания РНК на белке – R сайт, а место нуклеотидов в А и Е сайте

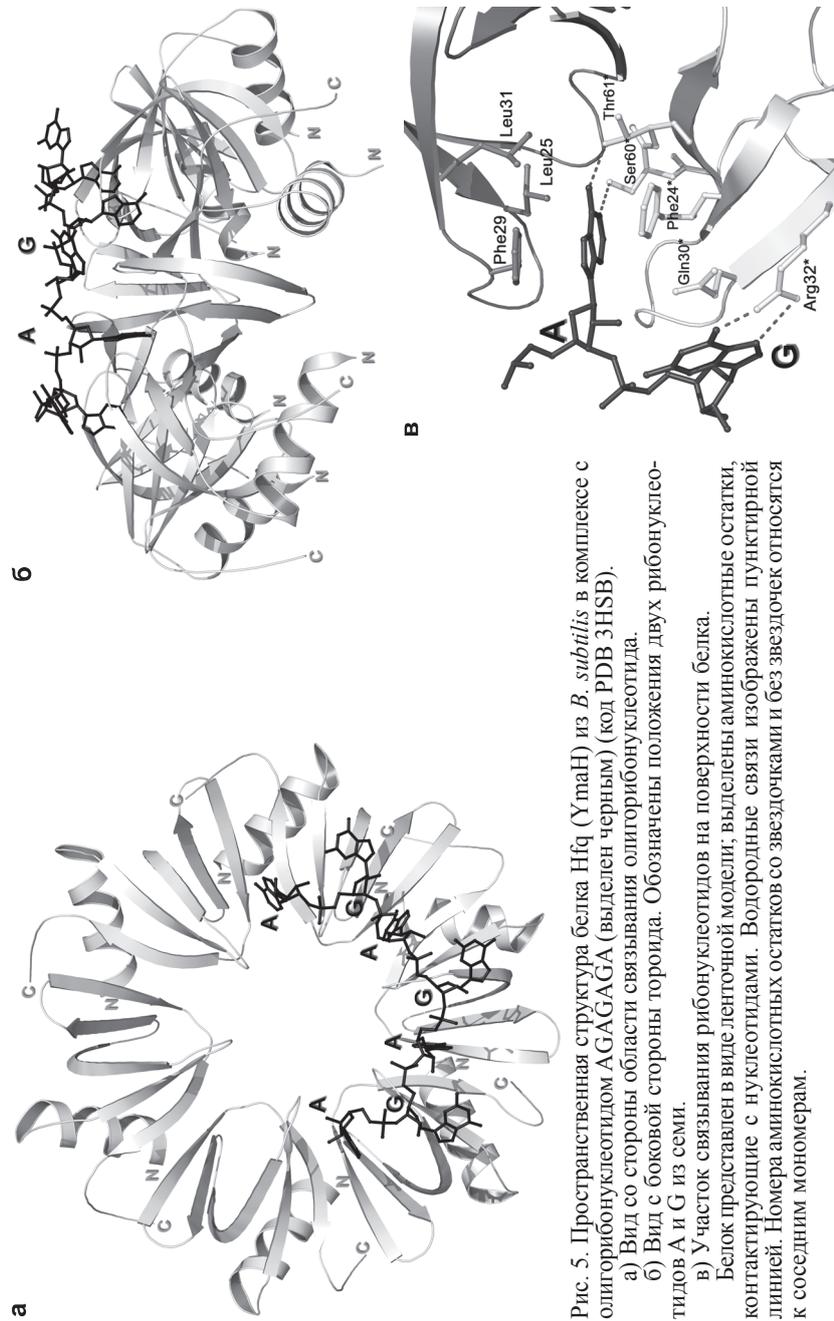


Рис. 5. Пространственная структура белка Hfq (YmaH) из *B. subtilis* в комплексе с олигорибонуклеотидом AGAGAGA (выделен черным) (код PDB 3HSB).

а) Вид со стороны области связывания олигорибонуклеотида.

б) Вид с боковой стороны тороида. Обозначены положения двух рибонуклеотидов А и Г из семи.

в) Участок связывания рибонуклеотидов на поверхности белка.

Белок представлен в виде ленточной модели; выделены аминокислотные остатки, контактирующие с нуклеотидами. Водородные связи изображены пунктирной линией. Номера аминокислотных остатков со звездочками и без звездочек относятся к соседним мономерам.

занимает единственный нуклеотид, который соединяет аденины по поверхности белка.

Таким образом, при связывании белком Hfq поли(А) РНК и близких ему последовательностей РНК, определяющим для их узнавания оказываются аминокислотные остатки, образующие РНК-узнающий R-сайт белка на дистальной поверхности белка.

СТЕХИОМЕТРИЯ СВЯЗЫВАНИЯ РНК С БЕЛКОМ HFQ

Поскольку белок Hfq способствует взаимодействию различных РНК, таких как мРНК и регуляторные РНК, то большой интерес вызывает вопрос стехиометрии связывания РНК с Hfq, а именно – может ли белок связывать несколько молекул РНК одновременно? До настоящего времени данные по этому вопросу весьма противоречивы. Так в экспериментах по изотермической титрационной калориметрии показано соотношение РНК:белок = 1:1 для комплексов DsrA–Hfq₆ (гексамер белка Hfq) и rpoS–Hfq₆, но 1:2 для комплекса A₁₈–Hfq₆ [80]. Соотношение 1:1 для комплекса rpoS–Hfq₆, отличается от соотношения 1:2, найденного ранее для этого же комплекса методом изменения подвижности РНК в геле [83]. Аналогичные эксперименты по изменению подвижности в геле, выполненные позднее, показали соотношение 1:2 в комплексах DsrA–Hfq₆ и A₁₈–Hfq₆ [81]. Измерение флуоресцентной анизотропии для A₁₈–Hfq₆ показало соотношение РНК:белок = 1:2, которое, по всей видимости, свидетельствует о наличии двух независимых, но почти одинаковых акта взаимодействия белка с поли(А) РНК [81].

Последние данные по стехиометрии взаимодействия были получены в 2011 г. [84]. Для комплексов A₁₈–Hfq₆ и DsrA_{ДП} (домен II DsrA)–Hfq₆ методами масс-спектрометрии, аналитического центрифугирования, измерением анизотропной флуоресценции и изменению подвижности в геле было показано соотношение РНК:белок равно 1:1, причем укорачивание белка с С-конца не приводило к изменению стехиометрии взаимодействия. Авторы этой работы определили, что аналогичное соотношение 1:1 обнаруживается и в случае образования комплексов Hfq₆ с полноразмерными регуляторными РНК (DsrA, RrgA, OxyS) и 18-ти нуклеотидным фрагментом OxyS РНК. Более того, с помощью масс-спектрометрии было показано наличие пика для тройственного комплекса Hfq₆–A₁₈–DsrA_{ДП}, хотя величина этого пика позволяет сомневаться в стабильности такого комплекса в растворе.

В чем же причина такого расхождения результатов изучения стехиометрии в комплексах белка Hfq с РНК? По всей вероятности,

это может быть связано с различающимися протоколами выделения и очистки белка, что может привести к различиям в активности молекул или даже к частичной загрязненности препарата белка короткими фрагментами РНК или отдельными нуклеотидами. Это, в свою очередь, может сильно повлиять на взаимодействие белка с РНК. Белок Hfq из *E. coli*, который часто выделяется с такого рода примесями, иногда дает неожиданные результаты при изучении его взаимодействия с РНК. Таким образом, расхождения в экспериментах по связыванию могут объясняться различиями в экспериментальных подходах и условиях, разницей в чистоте препаратов и гомогенности образцов РНК. Пожалуй, окончательным ответом на вопрос о стехиометрии взаимодействия белка Hfq с различными молекулами РНК стали бы структурные данные по соответствующим РНК-белковым комплексам, что позволило бы напрямую определить сайты связывания белка на РНК и стехиометрию их взаимодействия.

БЕЛОК HFQ ВХОДИТ В СОСТАВ БЕЛКОВОЙ ФРАКЦИИ ХРОМОСОМНОЙ ДНК *ESCHERICHIA COLI*

Геномная ДНК *E. coli* ассоциирована примерно с 10 различными белками, обладающими ДНК-связывающими свойствами [85]. Количественный и качественный состав белковой фракции, по всей вероятности, влияет на характер упаковки, общую активность ДНК, а именно на процессы репликации, рекомбинации, репарации и транскрипции.

Белок Hfq входит в состав фракции белков нуклеоида и способен связываться с хромосомной ДНК в разных стехиометрических соотношениях в зависимости от фазы клеточного роста [86]. Во время экспоненциальной фазы клеточного роста Hfq является одним из преобладающих белков, связанных с хромосомной ДНК, что может говорить о его возможном влиянии на процессы репликации и транскрипции ДНК *E. coli*.

Показано, что Hfq обладает неспецифическим сродством к суперскрученной и релаксированной формам ДНК. Плазмидные ДНК связывают Hfq *in vitro* и *in vivo* в клетках *E. coli* [87]. По мере изменения скорости клеточных ростовых процессов происходит изменение состава белков нуклеоида, в том числе – вытеснение Hfq с хромосомной ДНК другими ДНК-связывающими белками при переходе в стационарную фазу роста. Конкретная роль Hfq в этих процессах пока не известна.

В 2010 г. была предпринята попытка локализовать на белке Hfq из *E. coli* область взаимодействия с ДНК и определить консенсус

нуклеотидов ДНК, узнаваемый белком Hfq [88]. Были идентифицированы фрагменты ДНК, связанные с белком Hfq при его выделении из клеток *E.coli*. Для 41 фрагмента ДНК длиной от 60 до 567 пар оснований определена первичная структура. Оказалось, что фрагменты ДНК включали 24 уникальные нуклеотидные последовательности, причем 13 из них встречались более одного раза (в работе приведены названия фрагментов генов, однако не приведены их последовательности). Для большей части обнаруженных фрагментов ДНК предсказана высокая вероятность их «изогнутости» и принадлежность к генам, кодирующим мембран-ассоциированные белки. Изогнутость фрагментов ДНК определялась согласно алгоритму, описанному Vlahovicek и др. [89]

Также было показано, что связывание рибо-олигонуклеотида A_{18} разрушает комплексы ДНК с Hfq [88]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что область связывания поли(А) РНК на дистальной стороне белка перекрывает область связывания ДНК. Поскольку минимальное измеренное значение K_d для комплексов с белком Hfq исследуемых в этой работе ДНК составило ~400 нМ, а K_d для комплекса белка Hfq с A_{16-27} РНК составило ~1,5 нМ, вытеснение ДНК из участков связывания на дистальной стороне белка поли(А) РНК представляется закономерным.

Для подтверждения этой гипотезы был получен ряд мутантных форм белка с единичными заменами аминокислот на аланины в области проксимальной, дистальной и боковых частей гексамера белка. Оказалось, что обе произведенные замены в дистальной области белка (Tyr25Ala и Lys31Ala) и одна на боковой поверхности (Arg16Ala) подавляют связывание ДНК с белком, в то время как шесть из семи замен на проксимальной (Gln8Ala, Arg17Ala, Phe39Ala, Phe42Ala) и боковой поверхностях (Phe11Ala, Arg19Ala) не приводят к заметным изменениям. Аминокислотные остатки Tyr25 и Lys31 формируют сайт связывания поли(А) РНК и являются необходимыми для её связывания.

Таким образом полученные результаты подтверждают идентичность расположения участков связывания поли(А) РНК и ДНК. Интересно отметить, что укорачивание белка Hfq из *E.coli* до 65 и 75 аминокислотных остатков также подавляет связывание ДНК, что говорит о большой значимости неупорядоченного в интактном белке Hfq длинного С-конца при взаимодействии с ДНК [88].

III. SM-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ АРХЕЙ

СТРУКТУРА АРХЕЙНЫХ LSM БЕЛКОВ

Архейные Lsm белки были впервые идентифицированы в 1999 г. при системном анализе геномов эукариот и архей [90]. Было найдено по две различных последовательности Sm-подобных белков в геномах *Methanobacterium thermoautotrophicum* и *Archaeoglobus fulgidus*, одна последовательность в геноме *Pyrococcus horikoshii* OT3 и ни одной последовательности в геноме *Methanococcus jannaschii*. Следует отметить, что позднее в *M. jannaschii* был идентифицирован Sm-подобный белок, негомологичный эукариотическим и архейным Lsm белкам, но гомологичный бактериальным белкам Hfq [38].

Таким образом, впервые было показано, что архейные геномы кодируют один или два Sm-подобных белка, которые принадлежат двум подсемействам, названных Sm1 и Sm2 [90]. Гомология между белками разных организмов семейства Sm1 составляет не менее 60% по последовательности, в то время как между Sm1 и Sm2 белками одного и того же организма сходство не превышает 30% [91].

Электронно-микроскопические изображения архейных Sm-подобных белков показали, что в отличие от бактериальных белков Hfq, которые формируют гексамерные кольца, они образуют тороиды из семи мономеров [92]. Пространственные структуры архейных белков семейства Sm1 из *M. thermoautotrophicum* [93], *P. aerophilum* [94] и *A. fulgidus* AF-Sm1 [91] подтвердили это (рис. 6). Все белки образовывали гомогептамеры тороидальной формы с межсубъединичными контактами, аналогичными контактам в димерах эукариотических Sm и в гексамерах бактериальных Hfq белков, что сразу же было трактовано как консервативность структур Sm-подобных белков в процессе эволюции.

Архейные LSM белки состоят из N-концевой α -спирали и пяти β -тяжей, формирующих Sm-фолд (рис. 7). Они имеют ряд характерных отличий от бактериальных и эукариотических LSM, несмотря на то, что область Sm1 мотива архейных белков гомологична остальным представителям данного семейства. Архейные LSM белки не имеют длинной C-концевой части, имеющейся у бактериальных и эукариотических белков. Они, как и эукариотические Sm белки, в области Sm2 мотива содержат консенсус RGXX (где X – заряженные аминокислотные остатки), а бактериальные белки – консенсус [Y/F] KNAI. Важной особенностью архейных белков является протяженная петля L4, соединяющая Sm1 и Sm2 мотивы, имеющаяся также в эукариотических Sm белках, но отсутствующая в белках Hfq. Архейные LSM белки формируют гептамеры, как и эукариотические

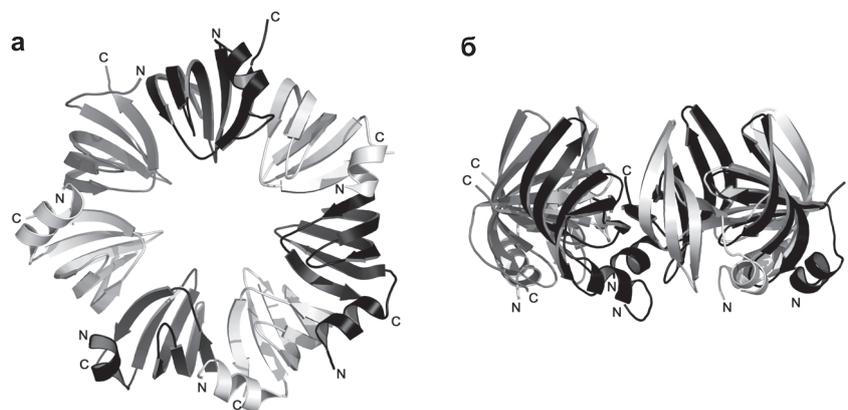


Рис. 6. Пространственная структура гептамерного LSm белка из археи *P. aerophilum* (код PDB 118F).

а) Вид со стороны центральной поры.

б) Вид с боковой стороны тороида.

Обозначены видимые на рисунке N- и C-концы мономеров белка.

Sm белки, а Hfq – гексамеры. Следует, однако, отметить, что архейные белки формируют свои четвертичные структуры из идентичных субъединиц белка, а эукариотические – из отличающихся по первичной структуре белков. Тем не менее, в целом архейные LSm белки значительно ближе к эукариотическим Sm белкам, чем к бактериальным белкам Hfq.

Структура представителя Sm2 семейства архейных белков AF-Sm2 из *A. fulgidus*, определенная в 2002 г., показала способность архейных белков формировать четвертичную структуру также и в виде гексамеров [95]. Гексамеры AF-Sm2 сильно отличаются от гептамеров AF-Sm1 по распределению зарядов на своей поверхности при сохранении общей структуры Sm-фолда и межсубъединичных контактов белков. Существование гексамеров AF-Sm2 в растворе была подтверждена масс-спектрометрией. Биохимические эксперименты показали зависимость степени олигомеризации белка AF-Sm2 от значений pH или присутствия РНК [96]. Так, при pH=4,5 образуется стабильный гексамер белка, а при pH=8,0 олигомеры белка AF-Sm2 вообще не образуются. Образование гептамера белка происходит лишь в присутствии РНК, причем стабильность комплекса гептамер–РНК снижается при повышении pH.

Было высказано предположение, что такое свойство белка AF-Sm2 можно объяснить взаимодействием остатков Glu19, Glu23 и Glu47 на поверхностях смежных мономеров белка AF-Sm2 [95]. При pH>7,0

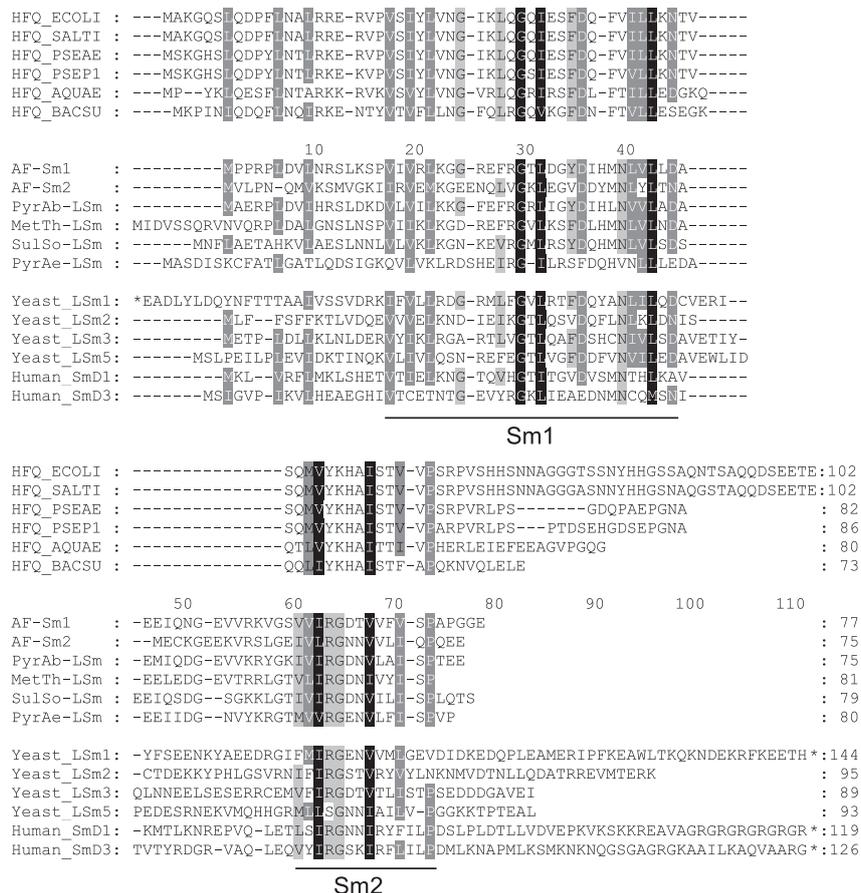


Рис. 7. Сравнение аминокислотных последовательностей архейных Lsm белков с представителями бактериальных белков Hfq и эукариотических Sm белков.

Последовательности: бактериальные – *Escherichia coli* (HFQ_ECOLI), *Salmonella typhimurium* (HFQ_SALTY), *Pseudomonas aeruginosa* (HFQ_PSEAE), *Pseudomonas putida* (HFQ_PSEP1), *Aquifex aeolicus* (HFQ_AQUAE), *Bacillus subtilis* (HFQ_BACSU); архейные – *Archaeoglobus fulgidus* AF-Sm1 и AF-Sm2, *Pyrococcus abyssi* (PyrAb-LSm), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MetTh-LSm), *Sulfolobus solfataricus* (SulSo-LSm), *Pyrobaculum aerophilum* (PyrAe-LSm); эукариотические – ряд Lsm белков из дрожжей (Yeast_LSm1, Yeast_LSm2, Yeast_LSm3, Yeast_LSm5) и ряд Sm белков человека (Human_SmD1, Human_SmD3).

Нумерация соответствует последовательности белка AF-Sm1. Консервативные среди всех приведенных последовательностей аминокислотные остатки выделены черным цветом, консервативные не менее чем среди 80% белков – темно-серым цветом, не менее чем в половине белков – светло-серым. В бактериальных последовательностях прямоугольником выделен консервативный мотив [Y/F]KNAI. Снизу обозначены области консервативных мотивов Sm1 и Sm2.

Звездочками обозначены укороченные области последовательностей белков.

карбокисильные группы глутаминовых кислот депротонированы, что должно дестабилизировать олигомерную форму из-за отталкивания близко расположенных отрицательно заряженных групп. При снижении pH боковые цепи глутаминовой кислоты протонируются, устраняя отталкивание близких зарядов, и образование гексамера становится возможным. Для проверки предложенной гипотезы были получены мутантные формы белка с единичными заменами Glu19, Glu23 или Glu47, и определена степень их олигомеризации в присутствии и отсутствии РНК при разных значениях pH [96]. Все мутантные белки в отсутствие РНК показали возросшую стабильность олигомера по сравнению с белком дикого типа, а добавление РНК приводило к образованию комплексов белка с РНК.

Таким образом, была подтверждена большая значимость Glu19, Glu23 и Glu47 при формировании четвертичной структуры белка, однако в настоящее время еще нет достаточно данных по структуре и функциям архейных Sm2-белков, для утверждения, что свойство AF-Sm2 уникально и не зависит от других факторов [96].

Еще одним интересным исключением из гептамерной организации архейных Lsm белков является 14-мерный белок из *Pyrobaculum aerophilum*, который был отнесен к новому семейству SmAP3 [97, 98] (рис. 8). Филогенетический анализ и поиск гомологов в базах данных аминокислотных последовательностей показал его уникальность. Он содержит дополнительный С-концевой домен, который участвует в формировании димера двух гептамеров. Один из гептамеров белка занимает апикальное положение, а второй – экваториальное, образуя цилиндр с центральной порой, при этом их С-концевые домены контактируют вне цилиндра с образованием неполярных областей контактов и большим количеством водородных связей. SmAP3 может формировать в растворе несколько возможных форм олигомеров с количеством мономеров кратных семи $(SmAP3)_{n=7,14,28}$. Как было показано, эта способность белка модулируется наличием в растворе двухвалентных катионов металлов, которые связываются с белком. В полученной авторами структуре было найдено 14 мест связывания катионов кадмия Cd^{2+} , причем апикальные и экваториальные субъединицы имели разные участки связывания ионов.

ФУНКЦИЯ АРХЕЙНЫХ LSM БЕЛКОВ

О функциях архейных LSm белков в организме до сих пор известно очень немного. Поскольку, по всей видимости, развитой системы сплайсинга в археях нет, то Sm подобные белки архей не могут участвовать в формировании сплайсосомы, как эукариотические Sm белки.

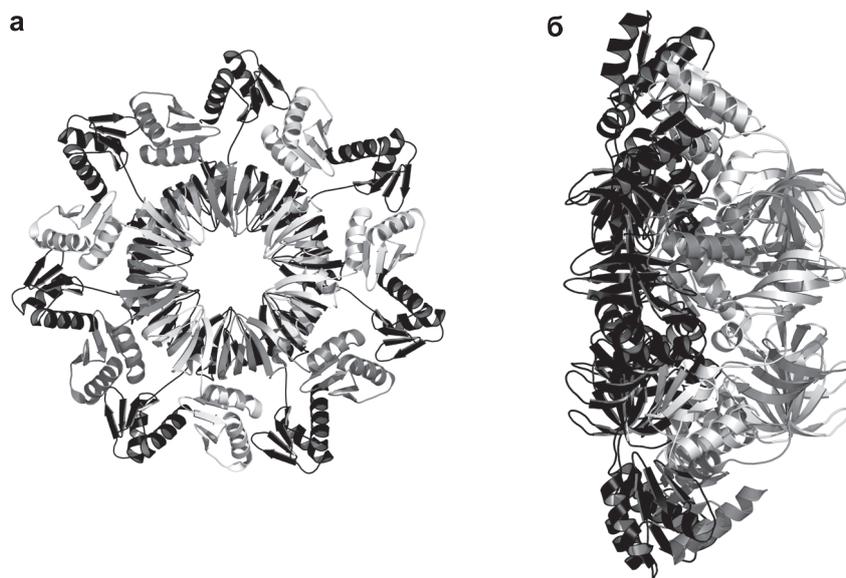


Рис. 8. Пространственная структура 14-мерного LSm белка из *P. aerophilum* SmAP3 (код PDB 1M5Q).

а) Вид со стороны центральной поры.

б) Вид с боковой стороны тороида.

Соседние мономеры выделены черным и серым цветом.

По всей видимости, в функциональном смысле они ближе к Sm-подобным белкам бактерий Hfq и принимают участие в процессинге РНК или являются посредниками при контактах различных РНК в клетках архей.

Структура белка AF-Sm1 из *Archaeoglobus fulgidus* в комплексе с олигорибонуклеотидом U_5 впервые показала детали взаимодействия РНК с гептамером Sm-подобного белка архей [91] (рис. 9). U_5 РНК связывается в центральной полости гептамерного кольца аналогично положению, наблюдаемому в комплексе белка Hfq из *S. aureus* с AU_5G [23]. Каждое основание олигорибонуклеотида располагается между боковыми цепями аминокислотных остатков His37 и Arg63 в кармане, сформированном высококонсервативными остатками белка одного мономера. Поскольку разрешение структуры комплекса составляет 2.75 \AA , то не удивительно, что в представленной структуре расстояния между атомами нуклеотидов и атомами белка достаточно сильно варьируют от основания к основанию и не наблюдается строгого совпадения межатомных расстояний для предполагаемых водород-

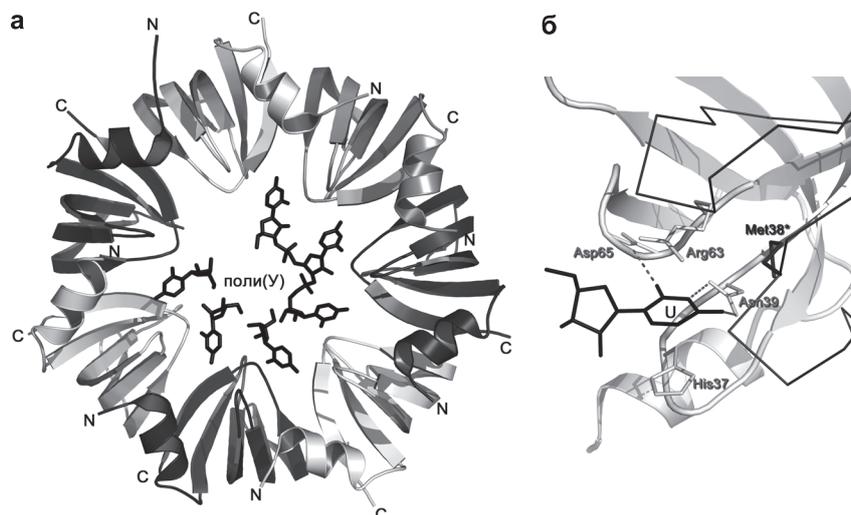


Рис. 9. Пространственная структура Lsm белка Hfq AF-Sm1 из *A. fulgidus* в комплексе с поли(У)₆ олигорибонуклеотидом (выделен черным) (код PDB 1I5L).

а) Вид со стороны области связывания поли(У)₆.

б) Участок связывания уридина на поверхности белка.

Один мономер белка представлен в виде ленточной модели, соседний – в виде линии, соединяющей Cα атомы аминокислотных остатков (выделена темно-серым цветом). Показаны аминокислотные остатки, контактирующие с нуклеотидами. Аминокислотный остаток Met38* ограничивает область связывания нуклеотида. Водородные связи изображены пунктирной линией. Номера аминокислотных остатков со звездочками и без звездочек относятся к соседним мономерам.

ных связей. Наиболее достоверным является наличие контактов атомов O4 и N3 урацила с атомами азота и кислорода боковой цепи Asn39, а также атома O2 с атомом азота главной цепи белка (остаток Asp65). Авторы утверждают, что такое положение боковой цепи Asn39 невыгодно для связывания цитозина, поскольку его метильная группа встретит стерические затруднения со стороны атомов аспарагина. С другой стороны, «дно» нуклеотид-связывающего кармана занимает Met38, который должен мешать вхождению в этот участок связывания большого пиримидинового основания. На основе полученных структурных данных авторы делают вывод, что рассмотренный участок связывания специфичен для У-богатых участков РНК.

В 2009 г. появились данные об участии sRNA в регуляции экспрессии генов в архее *Haloferax volcanii* [99, 100]. Эта галофильная архея имеет только один ген, кодирующий Lsm белок относящийся к

семейству Lsm1. По изменению подвижности в геле и данных масс-спектрометрии в мягких (нативных) условиях было определено, что Lsm белок образует комплексы с олиго(У) РНК длиной 15 и 30 нуклеотидов, тРНК и с несколькими малыми РНК [4]. Опыты по коиммунопреципитации с продуцированным *in vivo* белком FLAG-Lsm (с пришитым FLAG полипептидом) подтвердили, что белок связывается с более чем 15 различными малыми РНК, а также с более чем 30 различными белками, большая часть из которых участвует в регуляции транскрипции или метаболизме РНК. Делеционный штамм Δlsm *H. volcanii*, также полученный в этой работе, был способен к выживанию, но давал колонии меньшего размера и рос медленнее штамма дикого типа [4]. Удаление гена Lsm белка приводило к выраженному плейотропному фенотипу, что свидетельствует о вовлеченности белка во многие клеточные процессы, однако что это за процессы и какое участие принимает в них Lsm белок еще предстоит исследовать.

ОБРАЗОВАНИЕ LSM БЕЛКАМИ ФИБРИЛЛЯРНЫХ СТРУКТУР

Помимо образования четвертичной структуры в виде тороидальных гептамеров Lsm белки архей способны к образованию в растворе сложных фибриллярных структур. Подобная степень олигомеризации была показана для архейных Lsm белков из *Pyrobaculum aerophilum* и *Methanobacterium thermotrophicum* [97].

SmAP1 *M. thermotrophicum* при концентрации белка от 0,5 до 1,2 мг/мл воспроизводимо образует пучки фибрилл в буфере состава 10–25 mM Tris-HCl, при pH=6,5–7,5 и 20–60 mM NaCl. Диаметр фибрилл соизмерим с размером отдельно взятого гептамера SmAP1, что позволило предложить модель упаковки белка в фибриллы при которой ось гептамера параллельна оси фибриллы [97]. Несколько фибрилл могут ассоциировать боковыми частями и образовывать пучки или листы.

Аналогичные фибриллы образует и белок SmAP1 из *P. aerophilum*, однако для этого необходимы восстановительные условия. Оказалось, что в окислительных условиях SmAP1 *P. aerophilum* дикого типа образует связанный дисульфидным мостиком Cys8–Cys8 14-мер, в котором заряженные поверхностные остатки Lys4 располагаются на обоих концах димера гептамера. Каждый 14-мер удерживает форму голова-к-голове и электростатическое отталкивание поверхностей 14-меров за счет наличия на поверхностях заряженных лизинов препятствует образованию фибрилл. При добавлении агентов-восстановителей, которые разрушают дисульфидные мостики между гептамерами, либо при мутации в белке Cys8Ser, белок образует фибриллы [97].

Несколько позже были получены высокоупорядоченные фибриллы бактериального белка Hfq из *E. coli* [101], причем условия их получения значительно отличались от архейных: препарат белка сначала диализовали против раствора, содержащего 5 мМ Tris-HCl (рН=8,0), 5 мМ NaCl и 0,005% (w/v) додецил-β-D-мальтозида, затем лиофилизировали и ресуспендировали в воде. Был проведен анализ структур полученных фибрилл с использованием ИК-спектроскопии и электронной микроскопии с последующей реконструкцией структуры фибрилл на основании известной пространственной структуры гексамера белка. Оказалось, что они отличаются по форме и упаковке олигомеров от фибрилл, образованных архейными белками SmA1. Если SmA1 белки образуют трубкообразные полярные фибриллы с упаковкой голова-к-хвосту, то белок Hfq из *E. coli* формирует цилиндрические спирально-закрученные фибриллы, организованные из 6 гексамеров белка располагающихся тонким слоем по поверхности цилиндра. Диаметр такого цилиндра составил 170 Å, а угол между плоскостью гексамера и осью фибриллы – 37,7° (расчетные данные, полученные исходя из шага спирали в ~240 Å и расстоянием между плоскостями гомогексамеров Hfq ~40,5 Å) [101]. Таким образом, была показана возможность образования фибриллярных структур бактериальными белками Hfq, однако их структура отличается от фибрилл, образуемых архейными белками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценивая имеющиеся данные по структуре и функциям бактериальных белков Hfq можно сказать, что о них уже многое известно. Однако остается еще целый ряд нерешенных вопросов, начиная от причин высокой стабильности этих белков и до молекулярных принципов реализации этими белками своих функций. До настоящего времени существуют лишь гипотезы относительно того, как именно происходит регуляция трансляции мРНК при помощи регуляторных РНК и белка Hfq. Неизвестно как этот белок связывает большие молекулы РНК. Даже при оценке стехиометрии РНК-белковых комплексов существует большой разброс данных. Сейчас, когда активно исследуются принципы работы малых регуляторных РНК, эти вопросы остаются чрезвычайно актуальными.

Сравнивая структуры и функции бактериальных белков Hfq и архейных Sm-подобных белков можно найти много общего: наличие структурного Sm мотива, способность организовывать четвертичную структуру в виде тороидов из гомологичных мономеров белка, сходство структур РНК-связывающих участков, повышенное родство к

У-богатым участкам РНК и т.д. Исходя из этого можно предполагать, что в археях LSm белки, по всей видимости, должны выполнять сходные функции. Тем не менее, до настоящего времени о функции LSm белков архей еще практически ничего неизвестно. Дальнейшая работа в этой области представляет огромный интерес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O. (2007) *RNA Biol.*, **4**, 118–130.
2. Wilusz, C.J., Wilusz, J. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1031–1036.
3. Tharun, S. (2009) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **272**, 149–189.
4. Fischer, S., Benz, J., Späth, B., Maier, L., Straub, J., Granzow, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 34429–34438.
5. Chao, Y., Vogel, J. (2010) *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 24–33.
6. Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., Udesen, C. (2004) *Mol. Microbiol.*, **51**, 1525–1533.
7. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. (1975) *Ann. Intern. Med.*, **83**, 464–469.
8. Lerner, M.R., Steitz, J.A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5495–5499.
9. Lührmann, R., Kastner, B., Bach, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1087**, 265–292.
10. Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V.A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahm, H. (1995) *EMBO J.*, **14**, 2076–2088.
11. He, W., Parker, R. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 346–350.
12. Yong, J., Golembe, T.J., Battle, D.J., Pellizzoni, L., Dreyfuss, G. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 2747–2756.
13. Pomeranz Krummel D.A., Oubridge, C., Leung, A.K.W., Li, J., Nagai, K. (2009) *Nature*, **458**, 475–480.
14. Shapiro, L., Franze de Fernandez, M.T., August, J.T. (1968) *Nature*, **220**, 478–480.
15. Franze de Fernandez, M.T., Eoyang, L., August, J.T. (1968) *Nature*, **219**, 588–590.
16. Franze de Fernandez, M.T., Hayward, W.S., August, J.T. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 824–831.
17. Kajitani, M., Ishihama, A. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1063–1066.
18. Schuppli, D., Miranda, G., Tsui, H.C., Winkler, M.E., Sogo, J.M., Weber, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10239–10242.
19. Tsui, H.C., Feng, G., Winkler, M.E. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 7476–7487.
20. Zhang, A., Wassarman, K.M., Ortega, J., Steven, A.C., Storz, G. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 11–22.
21. Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 23–30.
22. Sun, X., Zhulin, I., Wartell, R.M. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3662–3671.
23. Schumacher, M.A., Pearson, R.F., Møller, T., Valentin-Hansen, P., Brennan, R.G. (2002) *EMBO J.*, **21**, 3546–3556.
24. Sauter, C., Basquin, J., Suck, D. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4091–4098.
25. Moskaleva, O., Melnik, B., Gabdulkhakov, A., Garber, M., Nikonov, S., Stolboushkina, E. (2010) *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **66**, 760–764.
26. Nikulin, A., Stolboushkina, E., Pereuderina, A., Vassilieva, I., Blaesi, U., Moll, I. (2005) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **61**, 141–146.
27. Bøggild, A., Overgaard, M., Valentin-Hansen, P., Brodersen, D.E. (2009) *FEBS J.*, **276**, 3904–3915.
28. Dienst, D., Dühring, U., Mollenkopf, H., Vogel, J., Golecki, J., Hess, W.R. (2008) *Microbiology*, **154**, 3134–3143.
29. Séraphin, B. (1995) *EMBO J.*, **14**, 2089–2098.
30. Murzin, A.G. (1993) *EMBO J.*, **12**, 861–867.

31. Musacchio, A., Gibson, T., Lehto, V.P., Saraste, M. (1992) FEBS Lett., **307**, 55–61.
32. Brennan, R.G., Link, T.M. (2007) Curr. Opin. Microbiol., **10**, 125–133.
33. Tsui, H.C., Leung, H.C., Winkler, M.E. (1994) Mol. Microbiol., **13**, 35–49.
34. Sonnleitner, E., Moll, I., Bläsi, U. (2002) Microbiology, **148**, 883–891.
35. Arluison, V., Folichon, M., Marco, S., Derreumaux, P., Pellegrini, O., Seguin, J. (2004) Eur. J. Biochem., **271**, 1258–1265.
36. Sittka, A., Sharma, C.M., Rolle, K., Vogel, J. (2009) RNA Biol., **6**, 266–275.
37. Nielsen, J.S., Lei, L.K., Ebersbach, T., Olsen, A.S., Klitgaard, J.K., Valentin-Hansen, P. (2010) Nucleic Acids Res., **38**, 907–919.
38. Nielsen, J.S., Bøggild, A., Andersen, C.B.F., Nielsen, G., Boysen, A., Brodersen, D.E. (2007) RNA, **13**, 2213–2223.
39. Vecerek, B., Rajkowitsch, L., Sonnleitner, E., Schroeder, R., Bläsi, U. (2008) Nucleic Acids Res., **36**, 133–143.
40. Olsen, A.S., Møller-Jensen, J., Brennan, R.G., Valentin-Hansen, P. (2010) J. Mol. Biol., **404**, 173–182.
41. Васильева Ю.М., Гарбер М.Б. (2002) Мол. биология, **36**, 1–9.
42. Soper, T., Mandin, P., Majdalani, N., Gottesman, S., Woodson, S.A. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**, 9602–9607.
43. Basineni, S.R., Madhugiri, R., Kolmsee, T., Hengge, R., Klug, G. (2009) RNA Biol., **6**, 584–594.
44. Sledjeski, D.D., Whitman, C., Zhang, A. (2001) J. Bacteriol., **183**, 1997–2005.
45. Nogueira, T., Springer, M. (2000) Curr. Opin. Microbiol., **3**, 154–158.
46. Aiba, H. (2007) Curr. Opin. Microbiol., **10**, 134–139.
47. Görke, B., Vogel, J. (2008) Genes Dev., **22**, 2914–2925.
48. Urban, J.H., Vogel, J. (2007) Nucleic Acids Res., **35**, 1018–1037.
49. Argaman, L., Altuvia, S. (2000) J. Mol. Biol., **300**, 1101–1112.
50. Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., Storz, G. (1998) EMBO J., **17**, 6061–6068.
51. Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A., Storz, G. (1998) EMBO J., **17**, 6069–6075.
52. Lease, R.A., Belfort, M. (2000) Mol. Microbiol., **38**, 667–672.
53. Sledjeski, D.D., Gupta, A., Gottesman, S. (1996) EMBO J., **15**, 3993–4000.
54. Vecerek, B., Beich-Frandsen, M., Resch, A., Bläsi, U. (2010) Nucleic Acids Res., **38**, 1284–1293.
55. Muffler, A., Fischer, D., Hengge-Aronis, R. (1996) Genes Dev., **10**, 1143–1151.
56. Brown, L., Elliott, T. (1996) J. Bacteriol., **178**, 3763–3770.
57. Dong, T., Schellhorn, H.E. (2009) Mol. Genet. Genomics, **281**, 19–33.
58. Loewen, P.C., Hengge-Aronis, R. (1994) Annu. Rev. Microbiol., **48**, 53–80.
59. Hengge-Aronis, R. (2000) Adv. Exp. Med. Biol., **485**, 85–93.
60. Hengge-Aronis, R. (1996) Mol. Microbiol., **21**, 887–893.
61. Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N., Fischer, D. (1993) J. Bacteriol., **175**, 259–265.
62. Hengge-Aronis, R. (1993) Cell, **72**, 165–168.
63. Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 11978–11982.
64. Webb, C., Moreno, M., Wilmes-Riesenberg, M., Curtiss, R.3., Foster, J.W. (1999) Mol. Microbiol., **34**, 112–123.
65. Jørgensen, F., Bally, M., Chapon-Herve, V., Michel, G., Lazdunski, A., Williams, P. (1999) Microbiology, **145** (Pt 4), 835–844.
66. Suh, S.J., Silo-Suh, L., Woods, D.E., Hassett, D.J., West, S.E., Ohman, D.E. (1999) J. Bacteriol., **181**, 3890–3897.
67. Badger, J.L., Miller, V.L. (1995) J. Bacteriol., **177**, 5370–5373.
68. Lange, R., Hengge-Aronis, R. (1994) Genes Dev., **8**, 1600–1612.
69. Yamashino, T., Ueguchi, C., Mizuno, T. (1995) EMBO J., **14**, 594–602.
70. Muffler, A., Traulsen, D.D., Fischer, D., Lange, R., Hengge-Aronis, R. (1997) J. Bacteriol., **179**, 297–300.

71. *Vecerek, B., Moll, I., Bläsi, U.* (2005) RNA, **11**, 976–984.
72. *Vytvytska, O., Jakobsen, J.S., Balcu-naite, G., Andersen, J.S., Baccarini, M., von Gabain, A.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 14118–14123.
73. *Hajnsdorf, E., Régnier, P.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 1501–1505.
74. *Folichon, M., Arluison, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Régnier, P., Hajnsdorf, E.* (2003) Nucleic Acids Res., **31**, 7302–7310.
75. *Takada, A., Wachi, M., Nagai, K.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **266**, 579–583.
76. *Wachi, M., Takada, A., Nagai, K.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **264**, 525–529.
77. *Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V.R., von Gabain, A., Bläsi, U.* (2000) Genes Dev., **14**, 1109–1118.
78. *Udekwi, K.I., Darfeuille, F., Vogel, J., Reimegård, J., Holmqvist, E., Wagner, E.G.H.* (2005) Genes Dev., **19**, 2355–2366.
79. *de Haseth, P.L., Uhlenbeck, O.C.* (1980) Biochemistry, **19**, 6146–6151.
80. *Mikulecky, P.J., Kaw, M.K., Brescia, C.C., Takach, J.C., Sledjeski, D.D., Feig, A.L.* (2004) Nat. Struct. Mol. Biol., **11**, 1206–1214.
81. *Sun, X., Wartell, R.M.* (2006) Biochemistry, **45**, 4875–4887.
82. *Link, T.M., Valentin-Hansen, P., Brennan, R.G.* (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**, 19292–19297.
83. *Lease, R.A., Woodson, S.A.* (2004) J. Mol. Biol., **344**, 1211–1223.
84. *Updegrove, T.B., Correia, J.J., Chen, Y., Terry, C., Wartell, R.M.* (2011) RNA, **17**, 489–500.
85. *Azam, T.A., Ishihama, A.* (1999) J. Biol. Chem., **274**, 33105–33113.
86. *Ishihama, A.* (1999) Genes Cells, **4**, 135–143.
87. *Takada, A., Wachi, M., Kaidow, A., Takamura, M., Nagai, K.* (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun., **236**, 576–579.
88. *Updegrove, T.B., Correia, J.J., Galletto, R., Bujalowski, W., Wartell, R.M.* (2010) Biochim. Biophys. Acta, **1799**, 588–596.
89. *Vlahovicek, K., Kaján, L., Pongor, S.* (2003) Nucleic Acids Res., **31**, 3686–3687.
90. *Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S., Séraphin, B.* (1999) EMBO J., **18**, 3451–3462.
91. *Törö, I., Thore, S., Mayer, C., Basquin, J., Séraphin, B., Suck, D.* (2001) EMBO J., **20**, 2293–2303.
92. *Achsel, T., Stark, H., Lührmann, R.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 3685–3689.
93. *Collins, B.M., Harrop, S.J., Kornfeld, G.D., Dawes, I.W., Curmi, P.M., Mabbitt, B.C.* (2001) J. Mol. Biol., **309**, 915–923.
94. *Mura, C., Cascio, D., Sawaya, M.R., Eisenberg, D.S.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 5532–5537.
95. *Törö, I., Basquin, J., Teo-Dreher, H., Suck, D.* (2002) J. Mol. Biol., **320**, 129–142.
96. *Kilic, T., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., Suck, D.* (2006) Protein Sci., **15**, 2310–2317.
97. *Mura, C., Kozhukhovskiy, A., Gingery, M., Phillips, M., Eisenberg, D.* (2003) Protein Sci., **12**, 832–847.
98. *Mura, C., Phillips, M., Kozhukhovskiy, A., Eisenberg, D.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 4539–4544.
99. *Soppa, J., Straub, J., Brenneis, M., Jellen-Ritter, A., Heyer, R., Fischer, S.* (2009) Biochem. Soc. Trans., **37**, 133–136.
100. *Straub, J., Brenneis, M., Jellen-Ritter, A., Heyer, R., Soppa, J., Marchfelder, A.* (2009) RNA Biol., **6**, 281–292.
101. *Arluison, V., Mura, C., Guzmán, M.R., Liquier, J., Pellegrini, O., Gingery, M.* (2006) J. Mol. Biol., **356**, 86–96.