БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 5, с. 603 – 616

УДК 577.21

RsfS – ФАКТОР ГИБЕРНАЦИИ ИЛИ ФАКТОР БИОГЕНЕЗА РИБОСОМЫ?

Обзор

© 2022 Б.Ф. Фатхуллин[1,2]*, А.Г. Габдулхаков[1], М.М. Юсупов[2,3]

[1] *Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: morgenstern100@mail.ru*

[2] *Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC), 67400 Илькирш-Граффенштаден, Франция*

[3] *Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Лаборатория структурного анализа биомакромолекул, 420111 Казань, Россия*

Поступила в редакцию 31.12.2021
После доработки 20.04.2022
Принята к публикации 20.04.2022

Появление структур бактериальных, архейных и эукариотических рибосом, полученных методами кристаллографии и криоэлектронной микроскопии, послужило толчком к исследованию внутриклеточных регуляторных белков, влияющих на различные этапы трансляции. Среди них присутствуют факторы гибернации рибосом, которые стали активно изучаться в последнее десятилетие. Они участвуют в регуляции процесса биосинтеза белка в стрессовых для организма условиях. Основные задачи гибернационных факторов – снизить энергетические затраты на биосинтез белка и сохранить от деградации имеющиеся функциональные рибосомы, тем самым увеличив выживаемость клеток в неблагоприятных условиях. Несмотря на широкий интерес к данной теме, опубликовано всего несколько работ, посвящённых исследованию фактора RsfS (Ribosome silencing factor S). Согласно результатам этих работ, фактор RsfS принято относить к группе факторов гибернации. Однако последняя работа в области структурных исследований созревания 50S-субъединицы рибосомы демонстрирует наличие у RsfS признаков, присущих факторам биогенеза, например, ассоциированность с незрелой рибосомной субъединицей, как и у его митохондриального ортолога MALSU1. В данном обзоре мы обобщили имеющуюся информацию по фактору RsfS, его функциям и структурным особенностям, а также провели сравнительный анализ фактора с митохондриальным ортологом MALSU1, для того чтобы попытаться ответить на возникающий вопрос: «RsfS – фактор гибернации или фактор биогенеза рибосомы?» Данный обзор может послужить толчком для исследования молекулярных механизмов, в которых задействован фактор RsfS и которые на сегодняшний день остаются полностью неизвестными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, фактор биогенеза рибосомы, фактор гибернации, RsfS.

DOI: 10.31857/S0320972522050025, **EDN:** ASSKBQ

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – рибонуклеопротеидный комплекс, отвечающий во всех живых организмах за синтез белков и трансляцию генетического кода. У бактерий рибосома (70S) состоит из большой и малой субъединиц. Малая 30S-субъединица, содержащая 16S рибосомную РНК (рРНК) и около 20 рибосомных белков, связывает мРНК и обеспечивает опосредованное кодон-антикодоновое взаимодействие. Большая 50S-субъединица, состоящая из 23S- и 5S-рРНК и более 30 рибосомных белков, содержит каталитический сайт пептидилтрансферазы [1]. Трансляция – это четырёхэтапный процесс, состоящий из стадий инициации, роста полипептидной цепи, терминации и рециклинга рибосом. Каждый из этих этапов катализируется соответствующими трансляционными факторами: инициации, элонгации, терминации и рециклинга [2]. Одним из способов регуляции экспрессии генов является биогенез самого трансляционного аппарата [3]. Биогенез рибосомы – сложный многоступенчатый процесс, включающий в себя синтез и созревание рРНК, синтез, модификацию и фолдинг рибосомных

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; GTPBP – ГТФ-связывающий белок (GTP Binding Protein); HPF – фактор гибернации рибосомы (Hibernation Promoting Factor); MALSU1 – фактор митохондриальной сборки большой субъединицы рибосомы 1 (Mitochondrial Assembly of ribosomal Large Subunit 1); mt-ACP – митохондриальный белок-носитель ацильного остатка (mitochondrial Acyl Carrier Protein); RsfS – фактор сайленсинга рибосомы S (Ribosome silencing factor S).

* Адресат для корреспонденции.

белков и последовательную сборку рибосомных субъединиц [4]. Данный процесс жёстко контролируется широким спектром факторов биогенеза, среди которых транскрипционные факторы, эндорибонуклеазы, рРНК-хеликазы, молекулярные шапероны, ферменты, модифицирующие рРНК и белок, и факторы сборки рибосом [5]. Биогенез рибосом, а, следовательно, и количество готовых для трансляции рибосомных субъединиц напрямую зависит от стрессовых условий, клеточного цикла и от доступности для клетки питательных веществ [6, 7]. Клетки бактерий могут длительное время находиться в стационарной фазе роста, повышая свою устойчивость к воздействию со стороны окружающей среды [8]. Так как биосинтез белка является одним из самых энергозатратных процессов в бактериальной клетке (в *Escherichia coli* на это расходуется до 40% всего энергооборота), то функционирование аппарата трансляции должно строго регулироваться [3]. Контроль обеспечивается механизмами гибернации рибосом, которые запускаются индуцированными стрессом белками (стресс-факторами) – гибернационными факторами (рис. 1). Набор этих факторов в разных штаммах и видах различен [8–11]. К факторам гибернации относят HPF (Hibernation Promoting Factor), фактор, модулирующий рибосому (RMF, Ribosome Modulation Factor), фактор, ассоциированный с рибосомой ингибитор A (RaiA, Ribosome-associated inhibitor A) и энергозависимый регулятор трансляции A (EttA, Energy-dependent translational throttle A) [12]. В отличие от факторов биогенеза, ассоциированных с незрелыми рибосомами на этапе биогенеза, факторы гибернации нацелены на контроль уровня трансляции путём блокирования зрелых, готовых к трансляции, рибосом в неактивном состоянии. Именно к факторам гибернации принято относить и фактор сайленсинга рибосомы S (RsfS, ribosome silencing factor S) – однодоменный белок с молекулярной массой 13–15 кДа, ранее известный как YbeB [13–15]. На сегодняшний день в литературе имеется всего несколько работ, посвящённых фактору RsfS, наиболее значимыми результатами которых являются определение влияния делеции гена *rsfs* на рост культуры клеток *E. coli*, определение структуры гомодимера RsfS из *Mycobacterium tuberculosis*, структуры гетеродимера uL14 с RsfS и комплекса RsfS с 50S-субъединицей рибосомы из *Staphylococcus aureus*. Эти работы были выполнены в рамках концепции фактор RsfS – стресс-фактор, что согласовывалось с получаемыми результатами. Однако последняя работа, посвящённая исследованию созревания 50S-субъединицы рибосомы из *E. coli*, продемонстрировала возможность участия фактора RsfS, как фактора биогенеза рибосомы, что не соответствует концепции гибернационного фактора. Данный факт дополнительно подтверждается наличием структурных и функциональных аналогий между RsfS и фактором биогенеза митохондриальной рибосомы MALSU1 (Mitochondrial Assembly of ribosomal Large Subunit 1 или фактор митохондриальной сборки большой субъединицы рибосомы 1).

В данном обзоре мы попытались разобраться в возникшем противоречии классификации фактора RsfS, а также привлечь внимание научного сообщества к «белым пятнам» в молекулярных механизмах, в которых задействован фактор RsfS. В частности, на сегодняшний день не известно: за счёт каких механизмов происходит активация/инактивация внутриклеточного синтеза фактора RsfS; как регулируется его количество в цитоплазме и задействованы ли в этом алармоны [16], характерные регуляторы для стресс-факторов; каков механизм диссоциации RsfS от 50S-субъединицы рибосомы и имеется ли белок-регулятор этого процесса? Мы считаем, что собранная в этом обзоре информация может послужить базисом для новых исследований в этом направлении.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ПОИСК ПАРТНЕРОВ ФАКТОРА RsfS

Фактор RsfS, а точнее являющийся им гипотетический белок YbeB, был выделен из пула неохарактеризованных консервативных белков как один из приоритетных консервативных белков [14], ген которого (или его ортолога) был обнаружен как минимум в 2928 видах, включая большинство бактерий [17], растений (ортолог Iojap [13]) и человека (ортолог C7orf30 [18]). При этом выравнивание аминокислотных последовательностей RsfS даёт достаточно низкий процент идентичности, не превышающий 40%, в зависимости от организма [19]. Соседствующее расположение гена *ybeB* с геном *nadD* мононуклеотид аденилилтрансферазы никотиновой кислоты в геноме большинства бактерий позволило предположить участие данного белка в метаболизме NAD. Также сообщалось, что наличие или отсутствие продукта гена *ybeB* в *E. coli* не приводит к значительному изменению фенотипа клеток [20]. Первым этапом в определении функционального значения фактора RsfS (YbeB) в бактериальных клетках стала работа по обнаружению места его посадки [21]. Эксперименты по изотопному мечению белков и анализу профилей центрифугирования рибосом в градиен-

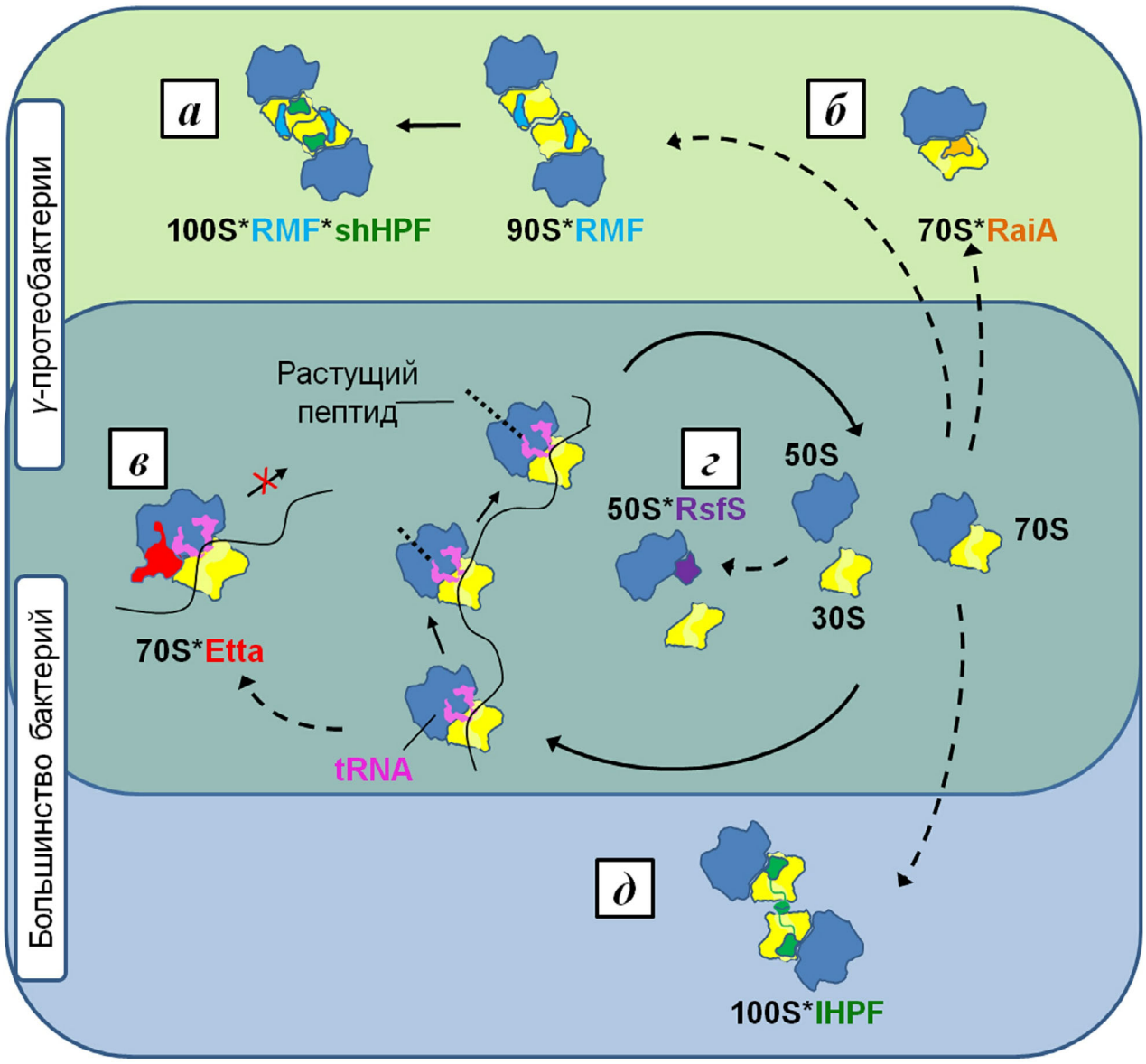

Рис. 1. Регуляция трансляции гибернационными факторами в γ-протеобактериях и других бактериях. При переходе в стационарную фазу или в условиях стресса наблюдается снижение уровня трансляции в γ-протеобактериях за счёт: образования 100S-димеров рибосом при участии фактора, модулирующего рибосому (RMF), и короткого фактора гибернации рибосомы (shHPF) (*а*); увеличения количества неактивных 70S-мономеров в комплексе с ассоциированным с рибосомой ингибитором A (RaiA) (*б*); остановки рибосом, прошедших этап инициации энергозависимым регулятором трансляции A (фактором EttA) (*в*) и предотвращения ассоциации 30S- и 50S-субъединиц фактором сайленсинга рибосомы S (RsfS) (*г*). В остальных бактериях снижение уровня трансляции в условиях стресса и стационарной фазы роста опосредовано через увеличение количества 100S-димеров рибосом, индуцированных длинным фактором гибернации рибосомы (lHPF) (*д*), а также через работу факторов EttA (*в*) и RsfS (*г*)

тах сахарозы продемонстрировали связанность фактора RsfS с большой 50S-субъединицей рибосомы, при этом комплексов RsfS с малой 30S-субъединицей, 70S-рибосомами и с полисомами не наблюдалось.

Следующим шагом стало исследование белок-белковых взаимодействий между RsfS и различными мишенями. В результате исследований сети белок-белковых взаимодействий в *Treponema pallidum* методом двугибридного анализа обнаружены взаимодействия ортолога фактора RsfS (TP0738) с белками GatC, bL9, InfA, uL29, bL31, Thil, Def, bL32 и RimM (таблица) [22]. Из полученных данных следовало, что RsfS может участвовать в процессе трансляции. Применение методов LC-MS и MALDI-TOF

для анализа белок-белковых взаимодействий в *E. coli* выявило ряд белков, контактирующих с фактором RsfS (YbeB) [23]. Среди них присутствовало четыре рибосомных белка большой 50S-субъединицы рибосомы: uL4, bL7/L12, uL14 и bL19 (таблица). Двугибридный анализ со всеми потенциальными партнёрами фактора RsfS, обнаруженными в *T. pallidum* [22] и *E. coli* [23], продемонстрировал наиболее сильное взаимодействие между RsfS и рибосомным белком uL14 как в *T. pallidum*, так и в *E. coli* [17]. Это взаимодействие оказалось консервативным и в протестированных клетках грамположительной бактерии *Streptococcus pneumoniae*, цианобактерии *Synechocystis PCC 6803*, *Zea mays* (ортолог Iojap и хлоропластный uL14) и *Homo sapiens* (ортолог C7orf30 и митохондриальный uL14). Таким образом, uL14 идентифицирован как основной специфический партнёр для связывания RsfS на большой субъединице рибосомы. Оставшиеся партнёры RsfS, с которыми фактор взаимодействует слабее, чем с uL14, оказались забыты. Мы считаем, что именно среди этих партнёров может находиться «ключ» к пониманию пока неизвестных этапов функционирования RsfS, например, его диссоциация и высвобождение 50S-субъединицы рибосомы. Обнаруженные молекулярные взаимодействия также могут свидетельствовать о наличии неизвестных нам молекулярных механизмов, в которых может быть задействован фактор RsfS.

МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ RsfS С 50S-СУБЪЕДИНИЦЕЙ РИБОСОМЫ

Теоретическая модель взаимодействия фактора RsfS с 50S-субъединицей рибосомы была предложена Hauser et al. [17] на основе молекулярного докинга и биохимических экспериментов. Для молекулярного докинга модель фактора RsfS *E. coli* была сгенерирована на основе гомологичных структур (PDB: 2ID1, 2O5A), модель рибосомного белка uL14 использовалась из кристаллической структуры 70S-рибосомы *E. coli* (PDB: 2AWB). Критерием отбора финальной модели являлось отсутствие стерических препятствий между фактором RsfS и компонентами 50S-субъединицы рибосомы при наложении сгенерированной модели гетеродимера

Белки, взаимодействие которых с RsfS протестировано методом двугибридного анализа

Белок	Организм	Описание (UniProt)	Источник
ThiI	*Treponema pallidum*	вероятная тРНК серотрансфераза ThiI	[22]
InfA		трансляционный инициаторный фактор IF-1	
bL32		рибосомный белок bL32 50S-субъединицы	
RimM		фактор созревания RimM	
Def		пептид деформилаза Def	
uL29		рибосомный белок uL29 50S-субъединицы	
bL9		рибосомный белок bL9 50S-субъединицы	
GatC		C-субъединица глутамил-тРНК (Gln) амидотрансферазы	
bL31		рибосомный белок bL31 50S-субъединицы	
DhaK	*Escherichia coli*	дигидроацетон киназа	[23]
YehL		АТФаза семейства MoxR	
YehQ		белок, содержащий домен SWIM (цинковый палец)	
bL19		рибосомный белок bL19 50S-субъединицы	
Cca		мультифункциональный CCA-белок	
uL4		рибосомный белок uL4 50S-субъединицы	
YihU		3′-сульфолактодегидроредуктаза	
bL7/L12		рибосомный белок bL7/L12 50S-субъединицы	
uL14		рибосомный белок uL14 50S-субъединицы	

Примечание. Представлены данные из работы Hauser et al. [17]. Список партнёров из *E. coli* предложен на основе масс-спектрометрического анализа комплексов с RsfS [23].

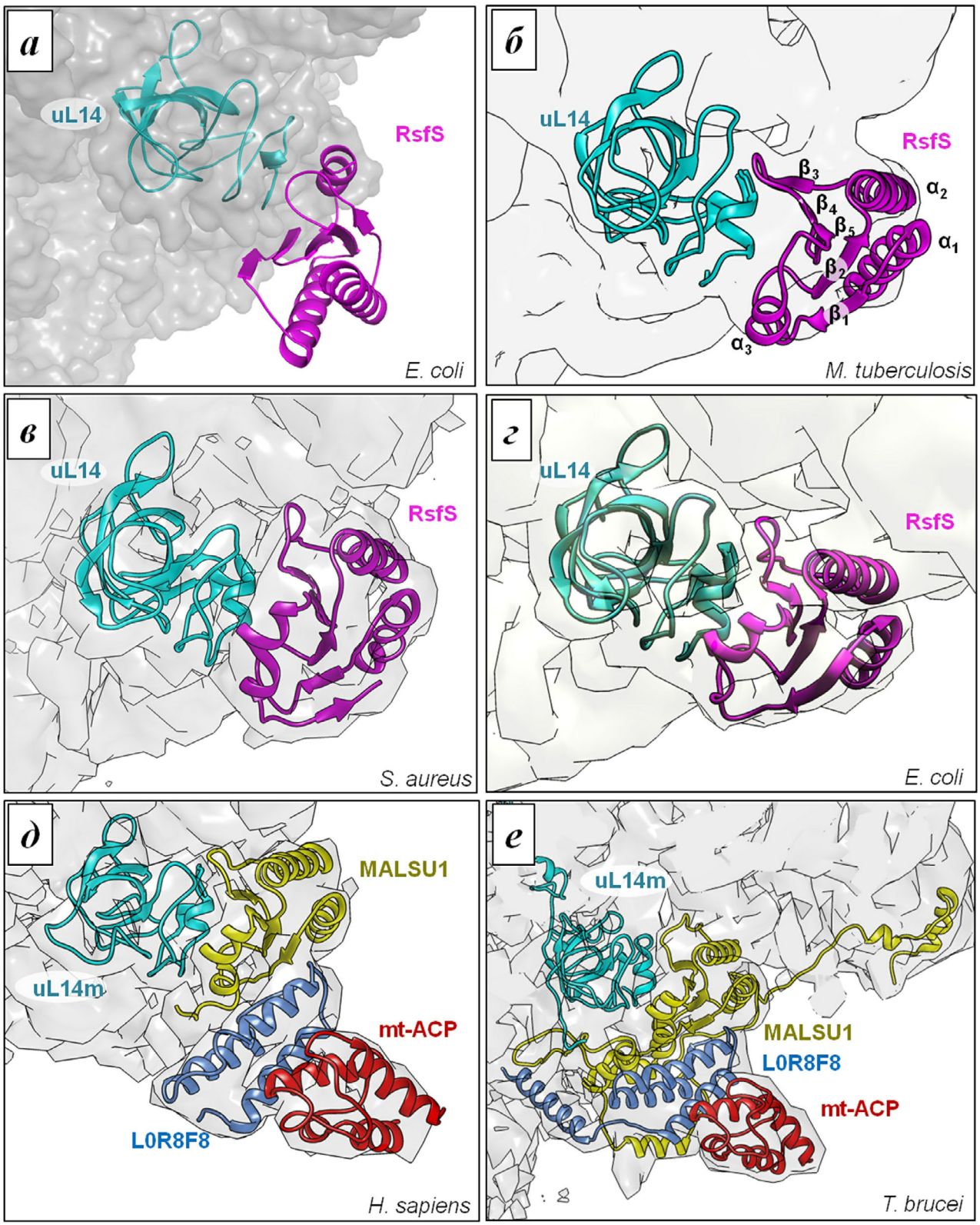

Рис. 2. Модели взаимодействия RsfS и его митохондриального ортолога MALSU1 с рибосомным белком uL14 в составе большой субъединицы рибосомы (серый). *а* – Теоретическая модель для *Escherichia coli* на основе биохимических экспериментов [17]. Модели на основе данных криоэлектронной микроскопии: *б* – комплекс из *Mycobacterium tuberculosis* [15]; *в* – комплекс из *Staphylococcus aureus* [19]; *г* – комплекс из *E. coli* [24]; *д* – комплекс из *Homo sapiens* [25] и *е* – комплекс из *Trypanosoma brucei* [26] с дополнительными белками L0R8F8 и митохондриальным белком-носителем ацильного остатка (mt-ACP)

RsfS*uL14 на структуры 70S-рибосомы *E. coli* (PDB: 2AWB, 2AW7). Для подтверждения теоретической модели комплекса RsfS с 50S-субъединицей рибосомы (рис. 2, *а*) в белке uL14 проводились одиночные замены на аланин а.о., расположенных в предполагаемой области контакта между RsfS и uL14 [17]. Далее методом двугибридного анализа отслеживалось сохранение гетеродимера RsfS и uL14. На основании полученных данных были идентифицированы а.о. в uL14, формирующие область контакта этих двух белков в *E. coli*: Lys114, Thr97, Arg98, Ser117, из которых первые два оказались наиболее критичными для сохранения комплекса, а замена Ser117Ala эффекта не оказала. При этом Thr97 и Arg98 участвуют в формировании межсубъединичного моста между 30S- и 50S-субъединицами 70S-рибосомы *E. coli*. Согласно предложенной теоретической модели взаимодействия RsfS и uL14, при посадке фактора на 50S-субъединицу блокируются Thr97 и Arg98 и возникают стерические препятствия для ассоциации субъединиц до 70S-рибосомы, что согласовывалось с биохимическими данными.

Первая кристаллическая структура изолированного фактора RsfS – это структура мутантной формы фактора с одиночной заменой Tyr102Ala из *M. tuberculosis* [15]. Так как авторам не удалось получить кристаллы полноразмерного фактора дикого типа, был применён скрининг мутантов RsfS с одиночными заменами а.о., предположительно, находящихся на поверхности белка. Только один из девяти мутантов – с заменой Tyr102Ala – сформировал кристаллы, отражавшие рентгеновские лучи с разрешением 2,1 Å. Согласно полученной структуре, фактор RsfS – однодоменный белок, имеющий укладку α1-β1-β2-α2-β3-β4-β5-α3, где пять β-тяжей образуют β-лист. Спирали α1 и α2 располагаются с одной стороны β-листа, а спираль α3 – на его краю с другой (взаимное расположение элементов вторичной структуры изображено на рис. 2, *б*).

Первая структура комплекса 50S-субъединицы рибосомы с фактором RsfS получена методом криоэлектронной микроскопией (крио-ЭМ) с разрешением 9 Å для *M. tuberculosis* [15]. В области рядом с рибосомным белком uL14 авторы обнаружили плотность, в которую вписали мономер кристаллической структуры фактора RsfS *M. tuberculosis* (рис. 2, *б*). Был сделан вывод, что водородные связи и электростатические силы, предположительно, являются превалирующим взаимодействием между RsfS и uL14, так как электростатический потенциал интерфейса RsfS, преимущественно, отрицательный, а uL14 – положительный. Контакты между ними формируются следующими элементами вторичной структуры: со стороны uL14 – это две *C*-концевые α-спирали (Arg104–Leu117); со стороны RsfS – это β-листы (β1, Val26–Asp30; β2, Cys40–Gly46; β3, Arg72–Gly75; β4, Trp81–Asp85; β5, Ile89–His95), петля между β1- и β2-тяжами (Val31–Asp39) и *C*-концевая α3-спираль (Phe101–Gly109). Сравнение полученной структуры комплекса 50S*RsfS *M. tuberculosis* с предложенной Hauser et al. [17] теоретической моделью 50S*RsfS *E. coli* выявило существенное отличие: поворот фактора RsfS на 172° по нормали к плоскости интерфейсов. При этом взаимодействие RsfS с uL14 происходит через те же элементы вторичной структуры: α3-спираль, β-лист и петлю между β1- и β2-тяжами. Li et al. [15] протестировали влияние четырнадцати одиночных замен а.о. на факторе RsfS, формирующих интерфейс с uL14, на его способность ингибировать трансляцию. Только замена Glu74Ala позволила получить растворимый препарат белка, продемонстрировавший потерю активности фактора на 64%, что, скорее всего, связано со снижением аффинности RsfS к 50S-субъединице рибосомы.

Структура комплекса 50S-субъединицы с фактором RsfS из *S. aureus* с высоким разрешением (3,2 Å) получена методом крио-ЭМ в исследовании Khusainov et al. [19]. Модель взаимодействия в RsfS с uL14 (рис. 2, *в*) оказалась близка к модели из *M. tuberculosis* (рис. 2, *б*) и не совпадала с моделью для *E. coli* (рис. 2, *а*) [15, 17]. Кроме основного контакта в комплексе между RsfS и uL14, высокое разрешение позволило предположить наличие дополнительных потенциальных контактов между RsfS и 50S-субъединицей: с рибосомным белком bL19 и спиралью H95 23S рРНК (рис. 3, *а*). В частности, могут формироваться водородные связи между отрицательно заряженными а.о. Asp32 и Asp84 фактора RsfS и положительно заряженными а.о. Arg39, Arg41 и Gln43, находящимися в петле рибосомного белка bL19. Контакты между отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом спирали H95 23S рРНК и боковыми группами Gln49, Arg53 и Lys56 фактора RsfS также могут участвовать в его стабилизации на 50S-субъединице [19].

Для определения комплексообразующих взаимодействий между RsfS и uL14 *S. aureus* Khusainov et al. [19] получили кристаллическую структуру комплекса гетеродимера RsfS*uL14 с разрешением 2,3 Å. Сравнение кристаллической и крио-ЭМ-структур показало полную идентичность третичных структур uL14, в то время как RsfS в кристалле имел более компактную структуру. Высокое разрешение кристаллической структуры позволило определить сеть водород-

ных связей и области гидрофобных взаимодействий в интерфейсе гетеродимера. При этом основные контакты между а.о. Arg97, Arg107, Lys113 из uL14 и Glu70, Asp81, Tyr98 из RsfS являются консервативными в бактериях [19]. Из них только Arg97 и Lys113 обнаруживаются в списке важных остатков (Arg98 и Lys114 соответственно) для формирования комплекса RsfS*uL14 в *E. coli* [17]. В кристаллической структуре гетеродимера они образуют по одной водородной связи, что, возможно, опровергает их критичную значимость для комплекса в *S. aureus*. В ходе выделения и очистки RsfS *S. aureus* Khusainov et al. [19] не наблюдали гомодимерную фракцию, как в случае с RsfS *M. tuberculosis*, что может говорить либо о различии в механизмах действия, либо о необходимости модифицировать теоретическую модель работы фактора RsfS [15].

Последние данные в области исследования бактериального фактора RsfS получены на рибосомах *E. coli* методом крио-ЭМ Nikolay et al. [24]. Им удалось определить три структуры нативных комплексов 50S-субъединиц на поздних этапах созревания с факторами биогенеза. Также были определены структуры комплексов зрелой 50S-субъединицы с фактором RsfS и ГТФазой ObgE, являющейся бактериальным фактором созревания. В структурах трёх промежуточных этапов биогенеза рибосомы обнаружены

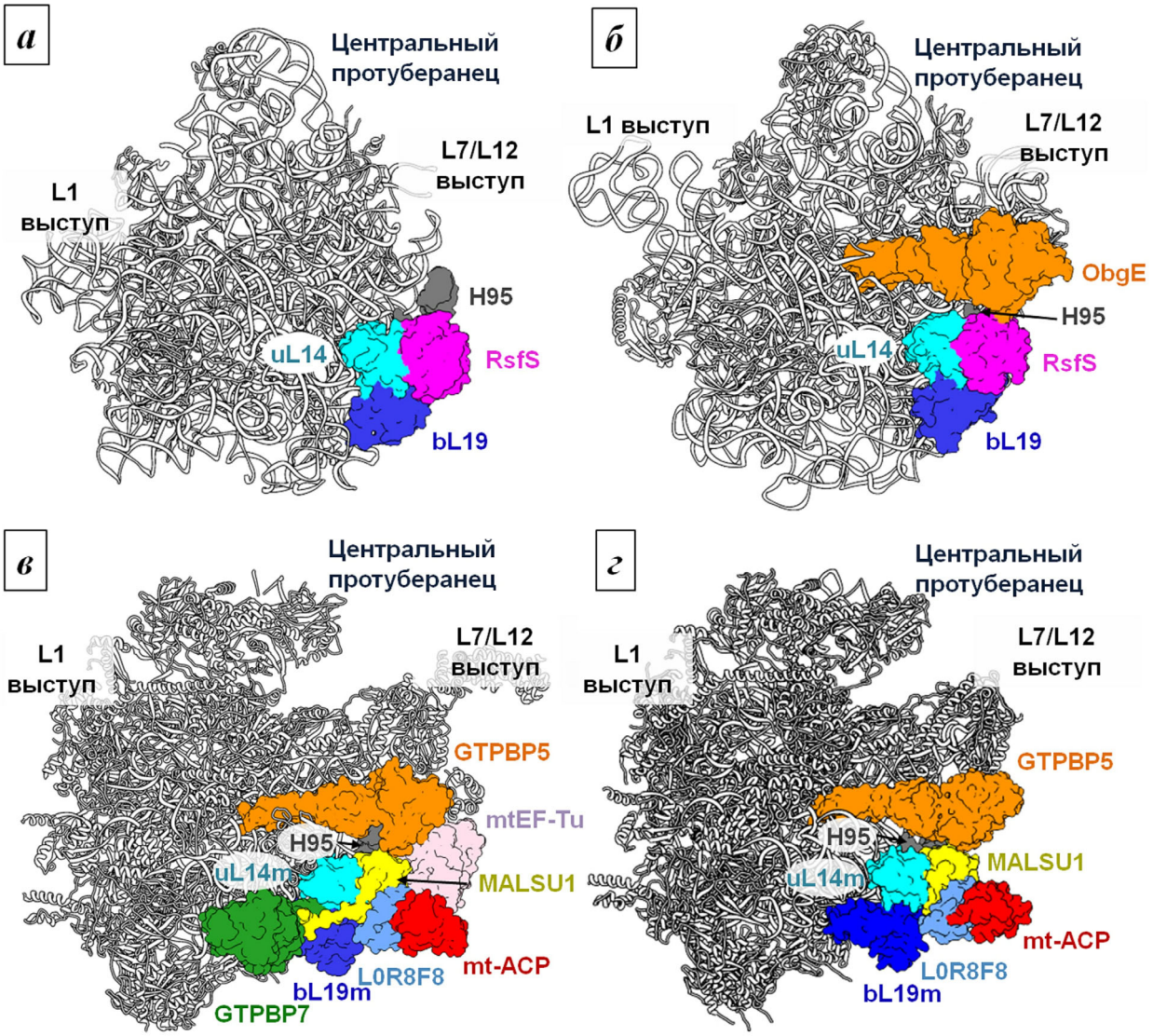

Рис. 3. Партнёры, взаимодействующие с RsfS и с его ортологом MALSU1, по данным крио-ЭМ: *а* – 50S-субъединица рибосомы *S. aureus* (PDB: 6SJ6); *б* – 50S-субъединица рибосомы *E. coli* (PDB: 7BL4); *в* и *г* – промежуточные состояния большой субъединицы миторибосомы *H. sapiens* (PDB: 7O9K, 7ODT)

плотности для факторов RsfS и ObgE [24]. Область связывания RsfS и его ориентация относительно 50S-субъединицы рибосомы (рис. 2, *г*) совпадает с полученными ранее структурами, что подтверждает консервативность данного механизма в бактериях и опровергает теоретическую модель Hauser et al. [17] для *E. coli* (рис. 2, *а*). Мы проанализировали интерфейс между 50S и RsfS *E. coli* (PDB: 7BL4). В нём присутствуют а.о., боковые группы которых могут формировать водородные связи между uL14 и RsfS в *E. coli* – Arg98, Gln93, Lys114, Arg108 на поверхности uL14 и Glu70, Asp81, Tyr98 – со стороны RsfS. При формировании комплекса Ile33, Met37, Trp77, Val79, Met90 на RsfS и Met113, Ile116, Leu118 – на uL14 становятся недоступными молекулам растворителя, формируя гидрофобное ядро. Список перечисленных аминокислот хорошо согласуются со списком аминокислот, формирующих интерфейс в гетеродимере uL14*RsfS из *S. aureus* [19], что позволяет интерпретировать результаты Hauser et al. [17] по влиянию мутаций на формирование комплексов uL14*RsfS в *E. coli*. Мы считаем, что Arg98 и Lys114 участвуют в формировании водородных связей, поэтому их боковые группы важны для стабилизации гетеродимера. Боковая группа Ser117 находится в области гидрофобного ядра, и её потеря не может оказать диссоциирующего эффекта. Причины, по которым боковая группа Thr97 является критичной для формирования гетеродимера, не очевидны, так как данная аминокислота находится на периферии интерфейса и никаких связей не образует. Возможно, боковая группа Thr97 участвует в правильном позиционировании боковой группы Tyr98 RsfS, которая, в свою очередь, формирует водородную связь и закрывает гидрофобное ядро в интерфейсе гетеродимера.

В структурах созревающих рибосом из *E. coli* [24] также обнаруживаются контакты, аналогичные структуре комплекса RsfS с рибосомой из *S. aureus* [19]: между положительно заряженными а.о. Lys36, Arg38 и Gln40 bL19 и отрицательно заряженными Ser32, Asp84 фактора RsfS. В сторону отрицательно заряженного сахарофосфатного остова спирали H95 23S pPHK направлены боковые группы Arg46, Gln57 и Arg60 RsfS, вероятно, участвующие в стабилизации фактора на 50S-субъединице *E. coli*. Комплекс зрелой 50S-субъединицы *E. coli* с RsfS и ObgE, полученный со средним разрешением крио-ЭМ-карты в 2,4 Å (рис. 3, *б*), позволил визуализировать взаимодействия между факторами [24]. Использование нерасщепляемого аналога ГТФ, GMPPNP, зафиксировало ГТФазу ObgE в связанном состоянии. Обнаружено, что RsfS (Arg46, His47) совместно со спиралью H95 23S pPHK (A2660–A2662) формируют аналог связывающего кармана для β-шпильки (Leu198–Val211) G-домена ObgE, при этом с противоположной стороны G-домен фиксируется спиралями H43 и H44 23S pPHK. Nikolay et al. [24] предполагают, что такое расположение может ограничивать подвижность G-домена ObgE и тем самым запускать ГТФазную активность.

Сравнивая результаты структурных исследований фактора RsfS и его комплекса с 50S-субъединицей рибосомы, мы обнаруживаем высокую схожесть моделей комплексов RsfS как со зрелыми 50S-субъединицами, так и с созревающими субъединицами. Площадь интерфейса между RsfS и uL14 значительно превосходит контакты RsfS с дополнительными партнёрами bL19 и H95 23S pPHK в комплексе с 50S-субъединицей рибосомы, что демонстрирует высокую аффинность фактора не к субъединице, а именно к рибосомному белку uL14, как к основному партнёру. Следовательно, можно предположить, что для связывания фактора RsfS на большой субъединице рибосомы необходим только лишь свободный интерфейс uL14. Это предположение подтверждается высокой аффинностью RsfS только к рибосомному белку uL14 [17, 23], наличием структуры гетеродимера RsfS с uL14 [19] и совпадением моделей созревающей и зрелой 50S-субъединиц рибосомы [15, 19, 24]. Из полученных структурных данных комплексов мы можем заключить, что добавление фактора RsfS к 50S-субъединице рибосомы *in vitro* (к зрелой или на любой стадии созревания) априори будет образовывать комплекс при условии доступности интерфейса рибосомного белка uL14. Именно так проводились эксперименты [15, 19]. Возможно, что таких комплексов не наблюдалось бы, если бы в смеси присутствовал агент, который либо запускает процесс диссоциации фактора RsfS с 50S-субъединицы рибосомы, либо препятствует связыванию фактора RsfS за счёт его инактивации. Khusainov et al. [19] выдвинули гипотезу, что для диссоциации фактора RsfS с 50S-субъединицы рибосомы необходим дополнительный ГТФазный фактор, по аналогии с HflX-механизмом высвобождения фактора гибернации HPF, который мог бы запускать процесс диссоциации через гидролиз ГТФ [27]. Сам факт наличия крио-ЭМ-комплексов [15, 19] говорит о том, что ни RsfS, ни субъединицы рибосомы процесс диссоциации фактора не регулируют. В случае созревающих рибосом *E. coli* [24] комплексы с RsfS были получены из лизатов клеток, собранных на экспоненциальной фазе роста клеточной культуры, что исключает нали-

чие стресса, как в стационарной фазе роста [17]. В целом это позволяет трактовать функцию фактора RsfS как фактора созревания большой субъединицы рибосомы, но, безусловно, нужны дополнительные функциональные тесты, которые однозначно бы продемонстрировали отличия в созревании большой субъединицы рибосомы в зависимости от наличия и отсутствия фактора RsfS в клетках.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАКТОРА RsfS

Поскольку делеционные мутанты с нарушенным процессом биогенеза рибосом приводят к холодочувствительным штаммам [28–30], то в первых тестах по определению функций фактора RsfS в бактериальных клетках *E. coli* проводилась оценка влияния отсутствия фактора RsfS на рост клеток. Эксперименты продемонстрировали, что делеция гена *rsfs* не приводит к холодочувствительному фенотипу [21]. Эксперименты по отслеживанию конкурентного роста штаммов *E. coli* Δ*rsfs* и дикого типа показали низкую конкурентоспособность клеток с делецией в богатой питательной среде и абсолютную неконкурентоспособность при переносе клеток в ходе их роста из богатой питательной среды в бедную [17]. Если в первом случае соотношение количества клеток дикого типа к клеткам делеционного штамма достигало значения 9 : 1 за 35 поколений, то во втором случае – всего за 5 поколений. Перенос клеток с делецией из богатой питательной среды в бедную также приводил к остановке их роста при достижении стационарной фазы на 14 часов с последующим возобновлением скорости удвоения до уровня скорости клеток дикого типа [22].

Эксперименты по экспрессии β-галактозидазы в клетках *E. coli* дикого типа и с делецией гена Δ*rsfs* выявили накопление продукта трансляции в стационарной фазе роста в клетках с делецией, в то время как в клетках дикого типа уровень экспрессии значительно снижался [17]. Аналогичное снижение трансляции наблюдалось и в экспериментах *in vitro* с бесклеточной системой трансляции. Фактор RsfS, связываясь со свободной 50S-субъединицей рибосомы, предотвращал ассоциацию 30S- и 50S-субъединиц и тем самым приводил к снижению уровня трансляции в 5 раз по сравнению с контролем. Стоит отметить, что такого эффекта не наблюдалось при добавлении фактора к 70S-рибосомам [17]. Полученные экспериментальные данные позволили сделать следующие выводы о функциях RsfS: фактор препятствует ассоциации рибосомных субъединиц до 70S-рибосомы, при этом не взаимодействует с транслирующими рибосомами (рис. 1, *г*). Отсутствие RsfS приводит к низкой адаптируемости клеток при переходе от богатой питательной среды к бедной и к снижению их жизнеспособности в стационарной фазе роста, что в итоге ведёт к гибели клеток [17].

Работа Hauser et al. [17] – первая работа, посвящённая исследованию бактериального фактора RsfS. Именно из её результатов вытекает гипотеза о факторе RsfS как о стресс-факторе. Смоделированные авторами условия голодания (перенос клеток из богатой питательной среды в бедную), как и стационарная фаза роста – это условия стресса, в которых отсутствие фактора RsfS приводило к снижению выживаемости клеток. Отсюда следует важное заключение о необходимости фактора RsfS в условиях стресса. Отсутствие накопления продуктов трансляции β-галактозидазы в стационарной фазе роста клеток *in vivo* (стрессовые условия), что также воспроизведено в экспериментах *in vitro*, является яркой демонстрацией функции RsfS – остановка трансляции ради выживания. Если рассматривать фактор RsfS с точки зрения концепции фактора созревания, то это подразумевает его активную вовлечённость в процесс биогенеза рибосомы. В этом случае RsfS должен быть важен на этапе активного роста и деления клеток (экспоненциальная фаза роста культуры клеток). Однако результат отсутствия фактора RsfS в делеционных мутантах *E. coli* проявляется только в стационарной фазе роста (стрессовые условия), когда большинство рибосом уже созрели и не нуждаются в факторах биогенеза.

В последней работе, посвящённой созреванию 50S-субъединицы *E. coli* [24], обнаружено, что как зрелые, так и незрелые 50S-субъединицы способны связывать ГТФазу ObgE. Однако только зрелые 50S-субъединицы стимулируют ГТФазную активность G-домена ObgE, которая увеличивается на 15% при добавлении RsfS [24]. Анализ ГТФазной активности с течением времени показал увеличение скорости гидролиза при добавлении фактора RsfS на 45%. Таким образом, одной из функций RsfS является стимуляция 50S-опосредованной ГТФазной активности ObgE [24].

Работа Nikolay et al. [24] – последняя вышедшая работа, в которой исследовался бактериальный фактор RsfS, и первая работа, в которой было сделано однозначное заключение, что фактор RsfS обладает функциями фактора созревания 50S-субъединицы рибосомы. В пользу данного утверждения приводятся функциональные тесты с обнаруженным стимулирующим эффек-

том фактора RsfS ГТФазной активности G-домена фактора биогенеза рибосомы ObgE. Действительно, если бы фактор RsfS не участвовал в биогенезе рибосомы, то сложно объяснить «случайно» возникший стимулирующий эффект ГТФазной активности ObgE от связывания RsfS на 50S-субъединице рибосомы.

MALSU1 – МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ОРТОЛОГ RsfS

Li et al. [15] выдвинули гипотезу, что RsfS может иметь более широкий спектр функций в клетках, помимо регуляции уровня трансляции. Такие выводы были сделаны на основе обнаруженных функций ортолога MALSU1 (ранее C7orf30) человека. Данный белок участвует в сборке и стабилизации большой субъединицы митохондриальных рибосом [18, 31, 32]. В эукариотической рибосоме с uL14 связывается фактор eIF6, который предотвращает преждевременную ассоциацию большой и малой субъединиц, однако структурной схожести с RsfS не имеет [33, 34].

В качестве подтверждения этой гипотезы можно рассматривать структуры позднего этапа созревания большой субъединицы митохондриальной рибосомы (миторибосомы) человека в комплексе с ортологом RsfS – MALSU1 [25]. Комплексы получены методом крио-ЭМ со средним разрешением 3 Å. В процессе интерпретации карт крио-ЭМ обнаружено, что фактор MALSU1 связан с белком uL14m большой субъединицы (рис. 2, *д*). 3D-Модель MALSU1 для крио-ЭМ-структуры была построена на основе ортолога из *M. tuberculosis*. Сравнение пространственных структур MALSU1 и RsfS *M. tuberculosis* показало их схожесть (rmsd = 1,9 Å), а контактирующая область согласовывалась с мутациями, которые приводили к диссоциации комплекса в *E. coli* [17]. В комплексе обнаружено взаимодействие MALSU1 с bL19m и сарцин-рициновой петлёй (H95) митохондриальной pPHK большой субъединицы, что, возможно, помогает правильному сворачиванию митохондриальной pPHK в ходе биогенеза. Эти контакты аналогичны описанным выше дополнительным контактам в комплексах RsfS с большой 50S-субъединицей рибосомы *S. aureus* и *E coli* [19].

В крио-ЭМ-карте комплекса в области посадки MALSU1 также обнаружена плотность, которую интерпретировали как соответствующую двум белкам. Первый белок – L0R8F8, непосредственно взаимодействующий с MALSU1, второй – митохондриальный белок-носитель ацильного остатка (mt-ACP, mitochondrial Acyl Carrier Protein), соединяющийся с L0R8F8 (рис. 2, *д*). В дальнейшем установлено, что L0R8F8 является митохондриальным элонгационным фактором 1 (MIEF1) и участвует в регуляции трансляции митохондриальных рибосом [35]. Белок mt-ACP также обнаружен в комплексах NADH, в сборке железосерного кластера и в созревании как большой, так и малой субъединиц митохондриальных рибосом *Trypanosoma brucei* [26, 36]. Предположительная функция тройного комплекса MALSU1*L0R8F8*mt-ACP заключается в организации стерического препятствия для преждевременной ассоциации большой и малой митохондриальных субъединиц рибосом. Одного фактора MALSU1 для этого может быть недостаточно из-за отсутствия спирали h14 в pPHK малой субъединицы митохондриальной рибосомы, столкновение с которой и препятствует ассоциации в случае бактериального RsfS. Brown et al. [25] предполагают, что тройной комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP эволюционировал совместно с эволюцией митохондриальной рибосомы для обеспечения стерического препятствия со спиралями h5, h15 митохондриальной pPHK и *N*-концом mS26 малой субъединицы рибосомы. На финальном этапе созревания данный комплекс должен покинуть большую субъединицу рибосомы для снятия стерических ограничений.

Комплекс из трёх факторов MALSU1*L0R8F8*mt-ACP идентифицирован в структуре промежуточного состояния созревающей миторибосомы для *T. brucei* (рис. 2, *е*). [26]. В двух полученных интермедиатах рибосом комплекс присутствовал только на более позднем этапе созревания, при этом характер его взаимодействия с рибосомой аналогичен описанному в работе Brown et al. [25], а именно: через контакт между MALSU1 и uL14m. Взаимное расположение элементов вторичной структуры в области контакта uL14 (uL14m) и RsfS (MALSU1) сохраняется как в бактериях, так и в митохондриях.

В работе, посвящённой исследованию системы контроля преждевременного прерывания трансляции, запускающей процесс высвобождения миторибосом *H. sapiens*, обнаружен тот же комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP [37]. На основе полученных крио-ЭМ-структур больших субъединиц миторибосом в комплексе с факторами высвобождения авторы выдвинули гипотезу о необходимости комплекса MALSU1*L0R8F8*mt-ACP как препятствия преждевременной ассоциации большой и малой субъединиц во время высвобождения тРНК и растущего полипептида. Это позволяет отнести MALSU1 в составе комплекса к таким факто-

рам, как eIF6, ABCE1 и eIF3, предотвращающим преждевременную ассоциацию рибосомных субъединиц в ходе инициации трансляции, рециклинга и биогенеза рибосомы.

Последние работы, посвящённые исследованию промежуточных состояний созревающих миторибосом *H. sapiens*, продемонстрировали наличие комплекса MALSU1*L0R8F8*mt-ACP практически во всех полученных структурах интермедиатов поздней стадии [38–41]. В одном из интермедиатных состояний созревающей большой субъединицы миторибосомы обнаружено формирование контактов между MALSU1 и mtEF-Tu, являющимся митохондриальным аналогом бактериального элонгационного фактора EF-Tu (рис. 3, *в*) [39]. Такой контакт, предположительно, становится возможным благодаря связыванию ГТФазы, являющейся гомологом бактериального фактора ObgE, ГТФ-связывающим белком (GTPBP5, GTP Binding Protein 5) (другое название MTG2, Mitochondrial Ribosome Associated GTPase 2). В остальных структурах связывание тройственного комплекса (mtEF-Tu*GTP*аа-тРНК) на большой субъединице миторибосомы затруднено из-за возникающих стерических препятствий между ним и комплексом MALSU1*L0R8F8*mt-ACP. Кроме контакта с mtEF-Tu, MALSU1 также взаимодействует с GTPBP5 и GTPBP7 (MTG1) – ещё одним фактором созревания, гомологом бактериального RbgA [39] (рис. 3, *в*). Контакт между GTPBP5 и MALSU1 присутствует и в других структурах созревающих миторибосом (рис. 3, *г*), однако GTPBP5, в отличие от ObgE, функционирует независимо от ортолога RsfS – MALSU1 [38, 41]. Ещё один митохондриальный функционально консервативный гомолог бактериального ObgE – GTPBP10. Он присутствовал в первом из девяти промежуточных состояний биогенеза большой субъединицы миторибосомы, практически все из которых содержали комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP [40]. Авторы не исключают, что фактор GTPBP10 может сохраняться и в более поздних интермедиатах. GTPBP10 в полученной структуре взаимодействовал с выступом L7/L12 и сарцин-рициновой петлёй, что характерно для этого семейства белков как в прокариотах, так и эукариотах. Так как GTPBP10 связывается в той же области, что и GTPBP5, предполагается, что они являются взаимоисключающими, при этом GTPBP10 на определённом этапе созревания субъединицы покидает своё положение, уступая место GTPBP5 [41]. Авторы серии работ, посвящённой исследованию созревания миторибосомы *H. sapiens*, сходятся во мнении, что комплекс MALSU1*L0R8F8*mt-ACP присоединяется на ранних этапах созревания большой субъединицы и покидает её на заключительном этапе, оказывая анти-ассоциативный эффект. ГТФазы GTPBP5 и GTPBP10, сохранив структуру, гомологичную бактериальному фактору ObgE, предположительно, имеют другую функцию в процессе сборки рибосомы, так как ассоциированы с более ранними её этапами и не регулируются ортологом RsfS.

Подводя итог обзору серии работ, посвящённых исследованию созревания большой субъединицы митохондриальной рибосомы, можно отметить схожесть анти-ассоциативного механизма рибосомных субъединиц, реализованного через факторы RsfS и MALSU1. Они имеют схожую третичную структуру, ассоциированы с аналогичными партнёрами на рибосоме (рибосомные белки uL14, bL19/mtL19, спираль H95 рРНК), взаимодействуют с фактором созревания ObgE/GTPBP5 и формируют стерические препятствия для ассоциации рибосомных субъединиц. При этом имеются и существенные отличия между RsfS и MALSU1. MALSU1 оказывает анти-ассоциативной эффект только в комплексе с L0R8F8 и mt-ACP, а RsfS – в одиночку. MALSU1 взаимодействует с гомологами бактериального фактора ObgE (GTPBP5 и GTPBP10) и фактором GTPBP7 (нет аналога в бактериях), но не регулирует их, в то время как RsfS стимулирует ГТФазную активность фактора ObgE.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя проведённый анализ, мы сталкиваемся с противоречивыми данными. С одной стороны, фактор RsfS – стресс-фактор, снижающий уровень трансляции в стационарной фазе роста культуры клеток за счёт анти-ассоциативного эффекта рибосомных субъединиц. Отсутствие фактора снижает выживаемость клеток в условиях голодания, но при этом не даёт холодочувствительный фенотип, как в случае с другими факторами созревания рибосом. С другой стороны, RsfS – фактор созревания биогенеза рибосомы, проявляющий анти-ассоциативный эффект на этапе сборки 50S-субъединицы. RsfS формирует комплексы с созревающими 50S-субъединицами рибосом, взаимодействует с фактором созревания ObgE и стимулирует его ГТФазную активность, имеет схожую структуру и область связывания с митохондриальным фактором созревания рибосомы MALSU1. Исходя из приведённых данных, можно предположить, что фактор RsfS является бифункциональным белком, который одновременно выполняет функции и стресс-фактора, и фактора биогенеза

рибосомы (к этому склоняется Nikolay et al. [24]). В этом случае возникают следующие вопросы. Почему не наблюдается фенотипического различия в штаммах с делецией Δ*rsfs*? Действительно ли наличие фактора RsfS на этапе сборки большой субъединицы рибосомы является критичным и к каким дефектам сборки 50S это приведёт? Объективно говоря, заключение, что фактор RsfS является фактором биогенеза рибосомы, сделано по косвенным признакам, так как напрямую не показано, как наличие или отсутствие фактора влияет на процесс сборки 50S-субъединицы рибосомы. Также остаётся открытым важнейший вопрос, касающийся регуляции функций RsfS. Если фактор действительно является бифункциональным, тогда как он ассоциирует/диссоциирует с незрелыми и созревшими рибосомами, и как происходит их распознавание? Вне зависимости от того, является ли RsfS фактором биогенеза или стресс-фактором, остаётся актуальным вопрос регуляции его связывания с большой субъединицей рибосомы. Мы считаем, что только детальное изучение этих вопросов позволит выявить причины и механизмы, включающие внутриклеточный синтез фактора RsfS и регулирующую его функциональную активность, а также поможет корректно классифицировать RsfS к той или иной группе факторов, отнесение к которым пока остаётся на уровне гипотез.

Финансирование. Работа выполнена на средства, выделенные по государственному заданию ФИЦ «Казанский научный центр РАН».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительная информация. Рисунки подготовлены с использованием программы Chimera [42].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Korostelev, A., Ermolenko, D. N., and Noller, H. F. (2008) Structural dynamics of the ribosome, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 674-683, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.08.037.
2. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., et al. (2012) One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 560-567, doi: 10.1038/nsmb.2313.
3. Wilson, D. N., and Nierhaus, K. H. (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 187-219, doi: 10.1080/10409230701360843.
4. Maksimova, E. M., Korepanov, A. P., Kravchenko, O. V., Baymukhametov, T. N., Myasnikov, A. G., et al. (2021) RbfA is involved in two important stages of 30S subunit assembly: Formation of the central pseudoknot and docking of Helix 44 to the decoding center, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22116140.
5. Guo, Q., Goto, S., Chen, Y. L., Feng, B. Y., Xu, Y. J., et al. (2013) Dissecting the *in vivo* assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2609-2620, doi: 10.1093/nar/gks1256.
6. Klinge, S., and Woolford, J. L. (2019) Ribosome assembly coming into focus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 116-131, doi: 10.1038/s41580-018-0078-y.
7. Ronneau, S., and Hallez, R. (2019) Make and break the alarmone: Regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **43**, 389-400, doi: 10.1093/femsre/fuz009.
8. Ueta, M., Wada, C., and Wada, A. (2010) Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF, *Genes Cells*, **15**, 43-58, doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01364.x.
9. Ueta, M., Wada, C., Daifuku, T., Sako, Y., Bessho, Y., et al. (2013) Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria, *Genes Cells*, **18**, 554-574, doi: 10.1111/gtc.12057.
10. Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., et al. (2005) Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*, *Genes Cells*, **10**, 1103-1112, doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00903.x.
11. Ueta, M., Ohniwa, R. L., Yoshida, H., Maki, Y., Wada, C., et al. (2008) Role of HPF (hibernation promoting factor) in translational activity in *Escherichia coli*, *J. Biochem.*, **143**, 425-433, doi: 10.1093/jb/mvm243.
12. Prossliner, T., Winther, K. S., Sorensen, M. A., and Gerdes, K. (2018) Ribosome hibernation, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 321-348, doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.
13. Han, C. D., Coe, E. H., and Martienssen, R. A. (1992) Molecular-cloning and characterization of iojap (Ij), a pattern striping gene of maize, *EMBO J.*, **11**, 4037-4046, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05497.x.
14. Galperin, M. Y., and Koonin, E. V. (2004) "Conserved hypothetical" proteins: Prioritization of targets for experimental study, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5452-5463, doi: 10.1093/nar/gkh885.
15. Li, X., Sun, Q., Jiang, C., Yang, K., Hung, L. W., et al. (2015) Structure of ribosomal silencing factor bound to *Mycobacterium tuberculosis* ribosome, *Structure*, **23**, 1858-1865, doi: 10.1016/j.str.2015.07.014.
16. Basu, A., Shields, K. E., Eickhoff, C. S., Hoft, D. F., and Yap, M. N. (2018) Thermal and Nutritional regulation of ribosome hibernation in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, **200**, doi: 10.1128/JB.00426-18.

17. Hauser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., et al. (2012) RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors, *PLoS Genet.*, **8**, e1002815, doi: 10.1371/journal.pgen.1002815.
18. Rorbach, J., Gammage, P. A., and Minczuk, M. (2012) C7orf30 is necessary for biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4097-4109, doi: 10.1093/nar/gkr1282.
19. Khusainov, I., Fatkhullin, B., Pellegrino, S., Bikmullin, A., Liu, W. T., et al. (2020) Mechanism of ribosome shutdown by RsfS in *Staphylococcus aureus* revealed by integrative structural biology approach, *Nat. Commun.*, **11**, 1656, doi: 10.1038/s41467-020-15517-0.
20. Bernhardt, T. G., and de Boer, P. A. (2004) Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity, *Mol. Microbiol.*, **52**, 1255-1269, doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04063.x.
21. Jiang, M., Sullivan, S. M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., et al. (2007) Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques, *J. Bacteriol.*, **189**, 3434-3444, doi: 10.1128/JB.00090-07.
22. Titz, B., Rajagopala, S. V., Goll, J., Hauser, R., McKevitt, M. T., et al. (2008) The binary protein interactome of *Treponema pallidum* – the syphilis spirochete, *PLoS One*, **3**, e2292, doi: 10.1371/journal.pone.0002292.
23. Butland, G., Peregrin-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., et al. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*, *Nature*, **433**, 531-537, doi: 10.1038/nature03239.
24. Nikolay, R., Hilal, T., Schmidt, S., Qin, B., Schwefel, D., et al. (2021) Snapshots of native pre-50S ribosomes reveal a biogenesis factor network and evolutionary specialization, *Mol. Cell*, **81**, 1200-1215.e1209, doi: 10.1016/j.molcel.2021.02.006.
25. Brown, A., Rathore, S., Kimanius, D., Aibara, S., Bai, X. C., et al. (2017) Structures of the human mitochondrial ribosome in native states of assembly, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 866-869, doi: 10.1038/nsmb.3464.
26. Jaskolowski, M., Ramrath, D. J. F., Bieri, P., Niemann, M., Mattei, S., et al. (2020) Structural insights into the mechanism of mitoribosomal large subunit biogenesis, *Mol. Cell*, **79**, 629-644.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.030.
27. Basu, A., and Yap, M. N. (2017) Disassembly of the *Staphylococcus aureus* hibernating 100S ribosome by an evolutionarily conserved GTPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E8165-E8173, doi: 10.1073/pnas.1709588114.
28. Gutgsell, N. S., Deutscher, M. P., and Ofengand, J. (2005) The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*, *RNA*, **11**, 1141-1152, doi: 10.1261/rna.2550105.
29. Charollais, J., Dreyfus, M., and Iost, I. (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2751-2759, doi: 10.1093/nar/gkh603.
30. Phadtare, S., and Inouye, M. (2008) The cold shock response, *EcoSal Plus*, **3**, doi: 10.1128/ecosalplus.5.4.2.
31. Wanschers, B. F., Szklarczyk, R., Pajak, A., van den Brand, M. A., Gloerich, J., et al. (2012) C7orf30 specifically associates with the large subunit of the mitochondrial ribosome and is involved in translation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4040-4051, doi: 10.1093/nar/gkr1271.
32. Fung, S., Nishimura, T., Sasarman, F., and Shoubridge, E. A. (2013) The conserved interaction of C7orf30 with MRPL14 promotes biogenesis of the mitochondrial large ribosomal subunit and mitochondrial translation, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 184-193, doi: 10.1091/mbc.E12-09-0651.
33. Gartmann, M., Blau, M., Armache, J. P., Mielke, T., Topf, M., et al. (2010) Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining, *J. Biol. Chem.*, **285**, 14848-14851, doi: 10.1074/jbc.C109.096057.
34. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6, *Science*, **334**, 941-948, doi: 10.1126/science.1211204.
35. Rathore, A., Chu, Q., Tan, D., Martinez, T. F., Donaldson, C. J., et al. (2018) MIEF1 microprotein regulates mitochondrial translation, *Biochemistry*, **57**, 5564-5575, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00726.
36. Saurer, M., Ramrath, D. J. F., Niemann, M., Calderaro, S., Prange, C., et al. (2019) Mitoribosomal small subunit biogenesis in trypanosomes involves an extensive assembly machinery, *Science*, **365**, 1144-1149, doi: 10.1126/science.aaw5570.
37. Desai, N., Yang, H. T., Chandrasekaran, V., Kazi, R., Minczuk, M., et al. (2020) Elongational stalling activates mitoribosome-associated quality control, *Science*, **370**, 1105-1110, doi: 10.1126/science.abc7782.
38. Lenarcic, T., Jaskolowski, M., Leibundgut, M., Scaiola, A., Schonhut, T., et al. (2021) Stepwise maturation of the peptidyl transferase region of human mitoribosomes, *Nat. Commun.*, **12**, 3671, doi: 10.1038/s41467-021-23811-8.
39. Cipullo, M., Gese, G. V., Khawaja, A., Hallberg, B. M., and Rorbach, J. (2021) Structural basis for late maturation steps of the human mitoribosomal large subunit, *Nat. Commun.*, **12**, 3673, doi: 10.1038/s41467-021-23617-8.
40. Cheng, J., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2021) A distinct assembly pathway of the human 39S late pre-mitoribosome, *Nat. Commun.*, **12**, 4544, doi: 10.1038/s41467-021-24818-x.
41. Hillen, H. S., Lavdovskaia, E., Nadler, F., Hanitsch, E., Linden, A., et al. (2021) Structural basis of GTPase-mediated mitochondrial ribosome biogenesis and recycling, *Nat. Commun.*, **12**, 3672, doi: 10.1038/s41467-021-23702-y.
42. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., et al. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612, doi: 10.1002/jcc.20084.

IS RsfS A FACTOR OF HIBERNATION OR A FACTOR OF RIBOSOME BIOGENESIS?

Review

B. F. Fatkhullin[1,2]*, A. G. Gabdulkhakov[1], and M. M. Yusupov[2,3]

[1] *Institute of Protein Research, Russian Academy of Science, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: morgenstern100@mail.ru*

[2] *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, 67400 Illkirch, France*

[3] *Laboratory of Structural Analyze of Biomacromolecules, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences", 420111 Kazan, Russia*

The appearance of bacterial, archaeal, and eukaryotic ribosome structures, obtained by crystallography and cryogenic electron microscopy, served as an impetus for the study of intracellular regulatory proteins that affect various stages of translation. Among them are ribosome hibernation factors, which have been actively studied in the last decade. They are involved in the regulation of protein biosynthesis under stressful conditions. The main tasks of hibernation factors are to reduce the energy consumption for protein biosynthesis and to preserve existing functional ribosomes from degradation, thereby increasing cell survival in unfavorable conditions. Although the wide interest to this topic, only a few works have been published to the study of the RsfS factor (Ribosome silencing factor S). According to their results, the RsfS factor is usually referred to the group of hibernation factors. However, a recent work in the field of structural studies of the 50S ribosomal subunit maturation demonstrates that RsfS has features inherent to biogenesis factors, for example, association with an immature ribosomal subunit, like its mitochondrial orthologue MALSU1. In this review, we summarized available information about the RsfS factor, its functions and structural features, and also carried out a comparative analysis of the factor with the mitochondrial ortholog MALSU1 in order to try to answer the emerging question: "Is RsfS a hibernation factor or a ribosome biogenesis factor?" This review may serve as an impetus for the study of molecular mechanisms in which the RsfS factor is involved, which, to date, remain completely unknown.

Keywords: ribosome, ribosome biogenesis factor, hibernation factor, RsfS