

УДК 548.73

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПОСТРИБОСОМНУЮ ЭРУ

© 2021 г. С. В. Тищенко¹, А. О. Михайлина¹, Н. В. Леконцева¹, Е. А. Столбоушкина¹,
Е. Ю. Никонова¹, О. С. Никонов¹, А. Д. Никулин^{1,*}

¹ Институт белка РАН, Пущино, Россия

*E-mail: nikulin@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 15.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 02.10.2020 г.

Структурные исследования РНК-белковых комплексов являются важным этапом в понимании многих молекулярных механизмов в клетке, например, таких как регуляция белкового синтеза и РНК-шаперонная активность белков. В обзоре рассмотрены различные объекты, исследующиеся в Институте белка РАН. На основе анализа структур комплексов рибосомного белка L1 со специфическими участками на мРНК и рРНК представлены принципы, по которым осуществляется регуляция белком трансляции мРНК своего оперона. Описаны исследования гетеротримерного фактора инициации трансляции IF2 архей и эукариот, приведены данные о взаимодействии глицил-тРНК-синтетазы с IRES вирусов. Приведены результаты исследований взаимодействия молекул РНК с одним из функционально важных участков белка Hfq и выявлены различия в РНК-связывающих свойствах Hfq и архейных белков семейства Lsm.

DOI: 10.31857/S0023476121050210

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Регуляторные комплексы рибосомного белка L1 с мРНК
2. Определение структуры и исследования РНК-связывающих свойств глобального регулятора трансляции – белка Hfq
3. Исследования РНК-связывающих свойств архейных Lsm белков
4. Исследование функции регуляторов транскрипции UxuR и ExuR
5. Структурные и функциональные исследования глицил-тРНК-синтетазы человека
6. Структурные исследования гетеротримерного фактора инициации трансляции 2

Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Определение структур бактериальных рибосом с помощью методов рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии на рубеже XX и XXI веков стало прорывным событием в исследованиях процесса биосинтеза белка в клетках. Важной стартовой частью этого проекта стало определение структур отдельных компонентов рибосомы, а именно, рибосомных белков

и их комплексов с фрагментами рибосомной РНК. Они позволили ускорить интерпретацию получаемых огромных карт электронной плотности рибосом, а также описать подвижные участки рибосомных субчастиц, которые не видны на структурах целых рибосом. В Институте белка РАН (ИБ РАН) найдены условия кристаллизации 70S рибосом и 30S рибосомных субчастиц *Thermus thermophilus*, определены структуры более пятнадцати рибосомных белков и ряда рРНК-белковых комплексов, что внесло существенный вклад в реализацию масштабного “рибосомного проекта”. Разработан комплексный подход к определению структур РНК-белковых комплексов, включающий в себя рациональный дизайн фрагментов РНК, образующих наиболее стабильные комплексы с белками, кристаллизацию этих комплексов, получение дифракционных данных на лабораторной установке Proteum (Bruker-AXS) и на источниках синхротронного излучения BESSY, DESY, ESRF, MAX IV с последующим определением структур методами многоволновой аномальной дифракции и мультидоменного молекулярного замещения. Накопленный опыт по структурно-функциональным исследованиям рРНК-белковых комплексов позволил перейти к решению новых задач, связанных с изучением целого ряда регуляторных комплексов. Исследования регуляции трансляции и транскрипции в

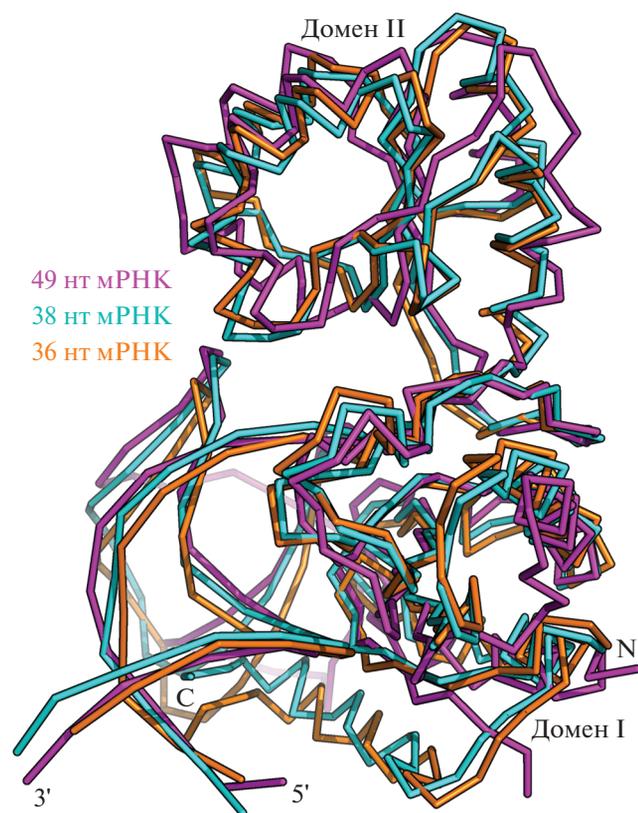


Рис. 1. Наложение структур комплексов рибосомного белка L1 с фрагментами мРНК длиной 49 нуклеотидов (серый, PDB ID 1U63), 38 нуклеотидов (белый, PDB ID 1ZHO) и 36 нуклеотидов (черный, PDB ID 2HW8). Указаны 5'- и 3'-концы РНК, домены I и II белка L1.

клетках на атомарном уровне позволяют находить ответы на новые вопросы, стоящие перед научным сообществом. В предлагаемом обзоре представлены краткие результаты наиболее интересных работ сотрудников ИБ РАН в этом направлении.

1. РЕГУЛЯТОРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1 С МРНК

Рибосомный двухдоменный белок L1 является составной частью L1-выступа большой субчастицы рибосомы; у прокариот этот белок также регулирует трансляцию белков своего оперона по принципу обратной связи. В *E. coli* белок L1 связывается с участком мРНК перед первым геном L1 оперона [1], в экстремально-термофильных бактериях *Thermus thermophilus* и *Thermotoga maritima* имеются два участка связывания на мРНК [2], в археях *Methanococcus vannielii* и *Methanococcus jannaschii* регуляторный участок на мРНК располагается в начале кодирующей последовательности первого гена L1 оперона [3, 4]. Исследование регуляторных свойств рибосомного белка L1

явилось естественным продолжением работ по изучению структурной основы биосинтеза белка.

Белок L1 – единственный рибосомный белок, регуляторные свойства которого детально исследованы на основе сравнительного анализа структур комплексов L1-рРНК и L1-мРНК. Для получения кристаллизуемых препаратов комплекса L1-мРНК применена стратегия, разработанная в ИБ РАН при исследовании структуры комплекса рибосомного белка S8 со специфическим фрагментом 16S рРНК [5]. Были получены 10 фрагментов мРНК длиной от 36 до 49 нуклеотидов, специфически связывающихся с белком L1. Менялась длина и нуклеотидный состав двух спиралей, фланкирующих ассиметричную петлю, содержащую консервативные нуклеотиды. Верхняя полноразмерная спирально-петельная часть фрагментов мРНК, не содержащая консервативных нуклеотидов, в укороченных вариантах была заменена четырехнуклеотидной петлей UUCG [6]. Семь фрагментов представляли собой различные вариации L1-связывающего фрагмента мРНК *M. vannielii*, три фрагмента являлись вариациями специфического участка мРНК *M. jannaschii*. Высокую мозаичность кристаллов удалось понизить добавлением солей ртути в кристаллизационную каплю. Были определены структуры трех комплексов: комплекса L1-мРНК (49 нт) из *M. jannaschii* (разрешение 3.4 Å [7]) и двух гетерологичных комплексов, образованных белком L1 *T. thermophilus* и короткими фрагментами мРНК *M. vannielii*, длиной 38 (разрешение 2.6 Å [8]) и 36 нт (разрешение 2.1 Å [9]).

Белок L1 в перечисленных комплексах контактировал преимущественно с атомами сахарофосфатного остова мРНК. Сравнение структур рибосомного [10, 11] и полученных регуляторных комплексов белка L1 показало, что белок образует сеть недоступных растворителю водородных связей с мотивом, содержащим строго консервативные нуклеотиды и расположенным в месте сочленения двух спиралей, структурно инвариантным как на мРНК, так и на рРНК. Со стороны белка L1 в этом взаимодействии участвуют расположенные рядом петли домена I (рис. 1).

Для исследования особенностей взаимодействия белка L1 со специфическими фрагментами мРНК и рРНК применяли комбинированный структурно-функциональный подход, добавив к структурному анализу метод поверхностного плазмонного резонанса, который позволяет наблюдать кинетику взаимодействия молекул в реальном времени [12]. Специфический фрагмент мРНК отличается от L1-связывающего фрагмента рРНК сильно укороченными участками, соответствующими спирали 78 и петле Б рибосомной РНК (рис. 2). Это приводит к понижению сред-

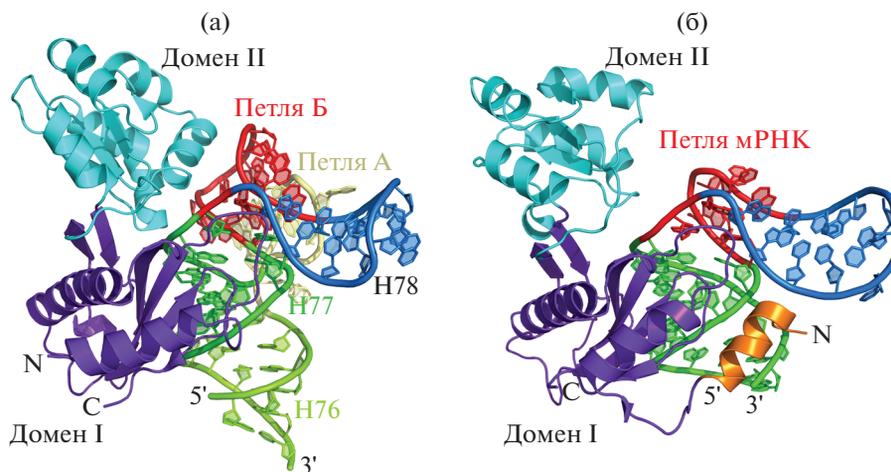


Рис. 2. Сравнение структур комплексов рибосомного белка L1 с фрагментом 23S рРНК (PDB ID 1MZP) (а) и белка L1 с мРНК (PDB ID 2HW8) (б). Указаны элементы структур РНК и белка.

ства белка L1 к мРНК на несколько порядков по сравнению с комплексом L1-рРНК.

Основная консервативная область контакта белка L1 расположена на его домене I и может быть разделена на два участка: один из них включает в себя консервативную триаду Thr-Met-Gly, образующую закрытые от растворителя водородные связи с нуклеотидами спирали H77 рРНК [13], другой – N-концевую часть спирали α_1 , взаимодействующую с нуклеотидами спирали H78 [14]. В комплексах белка L1 с мРНК и рРНК оба участка взаимодействия на домене I имеют одинаковые консервативные водородные связи, однако количество неконсервативных контактов в комплексе с мРНК уменьшается, что значительно снижает сродство белка к матричной РНК. Был получен домен I белка L1 в изолированном виде и показано, что он достаточен для взаимодействия как с рРНК, так и с мРНК [15, 16], а также обладает регуляторными свойствами целого белка [17]. Аминокислотные остатки домена II белка в рибосомном комплексе образуют дополнительные контакты с рРНК, что еще больше увеличивает стабильность рибосомного комплекса. Такое комплексное исследование комплексов белка L1 с мРНК и рРНК выявило причину разницы в сродстве белка к двум разным мишеням и позволило раскрыть основу регуляции трансляции рибосомным белком L1 по механизму обратной связи.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ ГЛОБАЛЬНОГО РЕГУЛЯТОРА ТРАНСЛЯЦИИ – БЕЛКА Hfq

РНК-связывающий бактериальный белок Hfq принадлежит к обширному семейству Sm/Lsm

белков и в бактериях выполняет роль многофункционального белка-регулятора трансляции [18]. Это небольшой белок размером ~ 10 кДа, формирующий в растворе четвертичную структуру в виде гексамера [18]. В 1979 г. белок Hfq был идентифицирован как хозяйский фактор, необходимый для репликации (+)-цепи РНК бактериофага Q β [19]. В дальнейшем было выявлено, что делеция гена *hfq* в клетках *Escherichia coli* приводит к изменению продукции более чем 30 различных белков, включая белки репарации ДНК [20], вовлеченные в метаболизм железа [21] и синтез σ^s -субъединицы бактериальной РНК-полимеразы [22]. В большинстве случаев регуляция трансляции белком Hfq реализуется посредством *транс*-кодируемых малых регуляторных РНК (**мрРНК**; в английской литературе используют аббревиатуру sRNA). Белок Hfq входит в когорту так называемых “РНК-шаперонов”, включающих в себя такие бактериальные регуляторные белки, как CsrA, ProQ, KhpA, KhpB, SpoVG, способствующие взаимодействию мрРНК со своими мишенями на мРНК [23]. Этот способ регуляции позволяет контролировать адаптацию бактерий к изменению внешней среды за короткое время. Hfq – наиболее универсальный белок среди РНК-шаперонов и обнаружен в большинстве бактерий. Он стимулирует взаимодействие мрРНК с комплементарными участками на мРНК с последующей репрессией или стимуляцией трансляции, а также регулирует время жизни мРНК за счет взаимодействия с их поли(А)3'-концевыми участками.

В начале 2000 г. были получены первые структуры белка из *Staphylococcus aureus* [24], укороченной формы белка из *E. coli* [25] и полноразмерного белка из *Pseudomonas aeruginosa* [26], что позволило предложить ряд гипотез о том, как белок

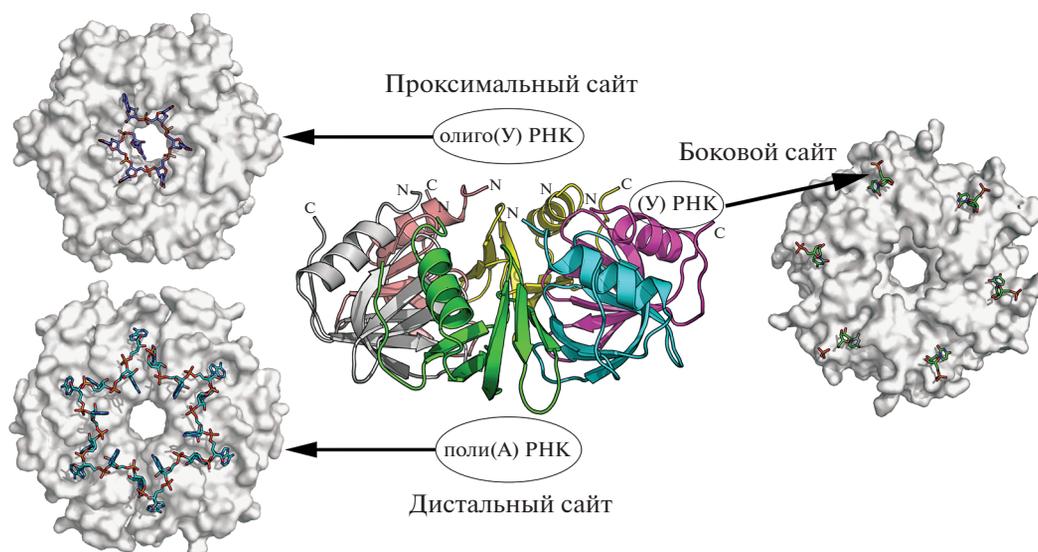


Рис. 3. Расположение участков взаимодействия белка Hfq с РНК. В центре — вид на гексамер белка с боковой стороны. Указаны N- и C-концы мономеров белка. Выделены области связывания РНК: уридин-специфический проксимальный сайт, аденин-специфический дистальный сайт и один из шести уридин-специфических боковых сайтов. Слева вверху показана структура комплекса белка Hfq с 5'-GUUUUUA-3' РНК [25] (вид с проксимальной стороны гексамера; PDB ID 1KQ2), слева внизу — структура комплекса Hfq с олиго(A) РНК [68] (вид со стороны дистального сайта; PDB ID 3GIB), справа посередине — структура комплекса Hfq с УМФ [28] (вид со стороны проксимального сайта; PDB ID 4J6X). Молекулы РНК и нуклеотидов показаны шаростержневой моделью на поверхности гексамеров белка Hfq.

способствует взаимодействию двух разных РНК. Были идентифицированы два основных участка связывания РНК на поверхности гексамера белка: уридин-специфический участок на “проксимальной” поверхности белка (со стороны N-концов мономеров белка) и аденин-специфический на противоположной, “дистальной”, поверхности (рис. 3).

Структуры комплексов Hfq с короткими фрагментами РНК показали детали узнавания оснований РНК аминокислотными остатками белка и объяснили его высокую специфичность к определенным последовательностям РНК. Интересно, что для разрушения вторичной структуры РНК белком Hfq не требуется дополнительной энергии в виде расщепления АТФ или ГТФ, однако ряд биохимических данных позволял предположить наличие АТФазной активности белка [27]. Мы получили структуру комплекса белка Hfq с АТФ и, исходя из особенностей контактов АТФ с аминокислотными остатками белка, сделали вывод, что вероятность специфической АТФазной активности Hfq крайне мала. Параллельно проверили возможность других одиночных нуклеотидов связываться с поверхностью белка и оказалось, что Hfq обладает высоким сродством к УТФ и ЦТФ, но не связывает ГТФ. Положение связанных нуклеотидов и ориентация их оснований полностью соответствовали таковым в структурах комплексов Hfq с олигонуклеотидами [28]. На ос-

нове этих наблюдений была предложена методика картирования участков связывания одноцепочечных РНК на поверхности РНК-связывающих белков [29, 30], которая в дальнейшем использовалась при исследовании гомологичных архейных Lsm белков. Более того, удалось идентифицировать третий, “латеральный” участок взаимодействия белка Hfq с РНК (рис. 3). Он расположен на боковой поверхности гексамера белка в области N-концевой спирали мономера и, как оказалось, является местом встречи и взаимодействия двух РНК — мРНК и мРНК. Данное открытие было сделано одновременно с идентификацией этого участка биохимическими методами, что подтвердило достоверность наших результатов [31–34]. Таким образом, мы впервые показали на структурном уровне, как происходит фиксация цепи РНК с последующим ее взаимодействием с белковым партнером. Эти данные внесли существенный вклад в дальнейшее развитие модели взаимодействия мРНК с мРНК с участием белка Hfq и процессов регуляции трансляции, опосредованное белками РНК-шаперонами.

3. ИССЛЕДОВАНИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ АРХЕЙНЫХ LSM БЕЛКОВ

Архейные Lsm белки (или SmAP — Sm Archaeal Proteins), как и бактериальные белки Hfq, принадлежат к семейству Sm/Lsm и имеют аналогичную третичную структуру из пяти-тяжелого β -ли-

ста с N-концевой α -спиралью [35]. Геномы различных видов архей могут кодировать от одного до трех паралога SmAP белков, классифицируемых как SmAP1, SmAP2 и SmAP3. Интересно, что SmAP1 и SmAP2 из клеток одного вида имеют меньшую степень гомологии, чем SmAP1 (или SmAP2) из клеток разных организмов. Однако все они имеют строгий консенсус по аминокислотной последовательности RGXX (где X – положительно заряженный аминокислотный остаток) в отличие от консенсуса YKNAI бактериальных белков Hfq (рис. 4а). Кроме этого, в отличие от большинства бактериальных белков Hfq архейные SmAP белки имеют удлиненную петлю L4, соединяющую тяжи β 3 и β 4, и лишены протяженной неупорядоченной C-концевой части. Наиболее заметное отличие SmAP от бактериальных гомологов – формирование ими четвертичной структуры в виде гомогептамеров (за редким исключением), а не гомогексамеров (рис. 4б). Этим свойством они ближе к своим эукариотическим гомологам – белкам Sm/Lsm, которые участвуют в процессинге РНК в клетках и, как правило, входят в состав различных РНП, таких как сплайсома. В отличие от бактериальных и эукариотических гомологов функции SmAP в архейных клетках не установлены. Имеются данные, что они связываются с рядом “незрелых” РНК, а также с белками, участвующими в процессинге РНК в клетках [36–39], что указывает на их возможную вовлеченность в созревание РНК, однако прямых доказательств функциональной роли SmAP белков пока не имеется.

Задачей проводимых исследований стало определение РНК-связывающих и РНК-шаперонных свойств белков SmAP с целью определения возможной функции этих белков в археях. Для этого применили описанную выше технику идентификации РНК-связывающих участков на поверхности SmAP белков, определив ряд структур комплексов белков с рибонуклеотидами. Полученные данные показали, что SmAP белки имеют только один, уридин-специфический РНК-связывающий сайт на проксимальной стороне гомогептамера [40, 41]. Таким образом, сложно предположить, что SmAP белки могут связывать две разные молекулы РНК и участвовать в регуляции трансляции посредством мРНК. Однако, как было показано ранее, SmAP белки могут разрушать структуру целевой РНК без участия второй, комплементарной, РНК, что потенциально позволяет этим белкам взаимодействовать с мРНК, изменять ее пространственную структуру и таким образом влиять на процесс трансляции. Следовательно, SmAP белки нельзя исключать из числа возможных регуляторов трансляции в археях, но для полного выяснения их функции требуются дополнительные исследования.

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИИ РЕГУЛЯТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ UxUR И ExuR

Экспрессия генов регулируется не только на уровне трансляции, но и на уровне транскрипции. Одним из примеров этого является регуляция метаболического процесса усвоения D-гексуроновых кислот, таких как D-глюкуронат и D-галактуронат (метаболический путь Эшвелла) [42, 43]. В бактериях этот путь является альтернативой наиболее известному гликолитическому пути метаболизма и играет заметную роль для выживания в стрессовых условиях. Процессы утилизации гексурононов находятся под контролем двух тесно взаимосвязанных регуляторов – UxuR и ExuR [44, 45]. Эти белки являются паралогами, так как ExuR, по-видимому, появился в результате дубликации гена *uxuR* [46], и относятся к семейству регуляторов GntR. К настоящему времени получены пространственные структуры нескольких белков этого семейства [46, 47], однако степень их гомологии с UxuR и ExuR составляет не более 25% [48]. Целью данной работы стало определение структур этих двух белков и их комплексов с регуляторными областями ДНК, в том числе в присутствии лигандов – глюкороната и галакторуната. Это позволило бы на молекулярном уровне описать регуляцию экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм гексурононов.

Получение белков в препаративных количествах было осложнено высокой склонностью белков UxuR и ExuR к агрегации и их токсичностью для клеток-продуцентов, поэтому пришлось тщательно подбирать условия их получения [49]. Эксперименты по определению сродства белков к целевым участкам ДНК подтвердили наличие двух различающихся участков связывания UxuR и ExuR, причем присутствие сахаров меняло сродство белков к ДНК. Нестабильность белков в условиях кристаллизации не позволила получить кристаллы белков в свободном состоянии и в комплексах с лигандами и/или фрагментами ДНК, поэтому структуры таких комплексов промоделированы с помощью методов гибкого докинга на основе структур гомологичных белков [50]. Это позволило локализовать предположительный участок связывания сахаров в области C-концевых доменов UxuR, совпадающий с местом, предсказанным ранее по данным мутагенеза.

Применение современных методов молекулярного моделирования и молекулярной динамики позволяет получить интересные данные по взаимодействию молекул, однако только определение структур комплексов может подтвердить достоверность расчетных моделей.

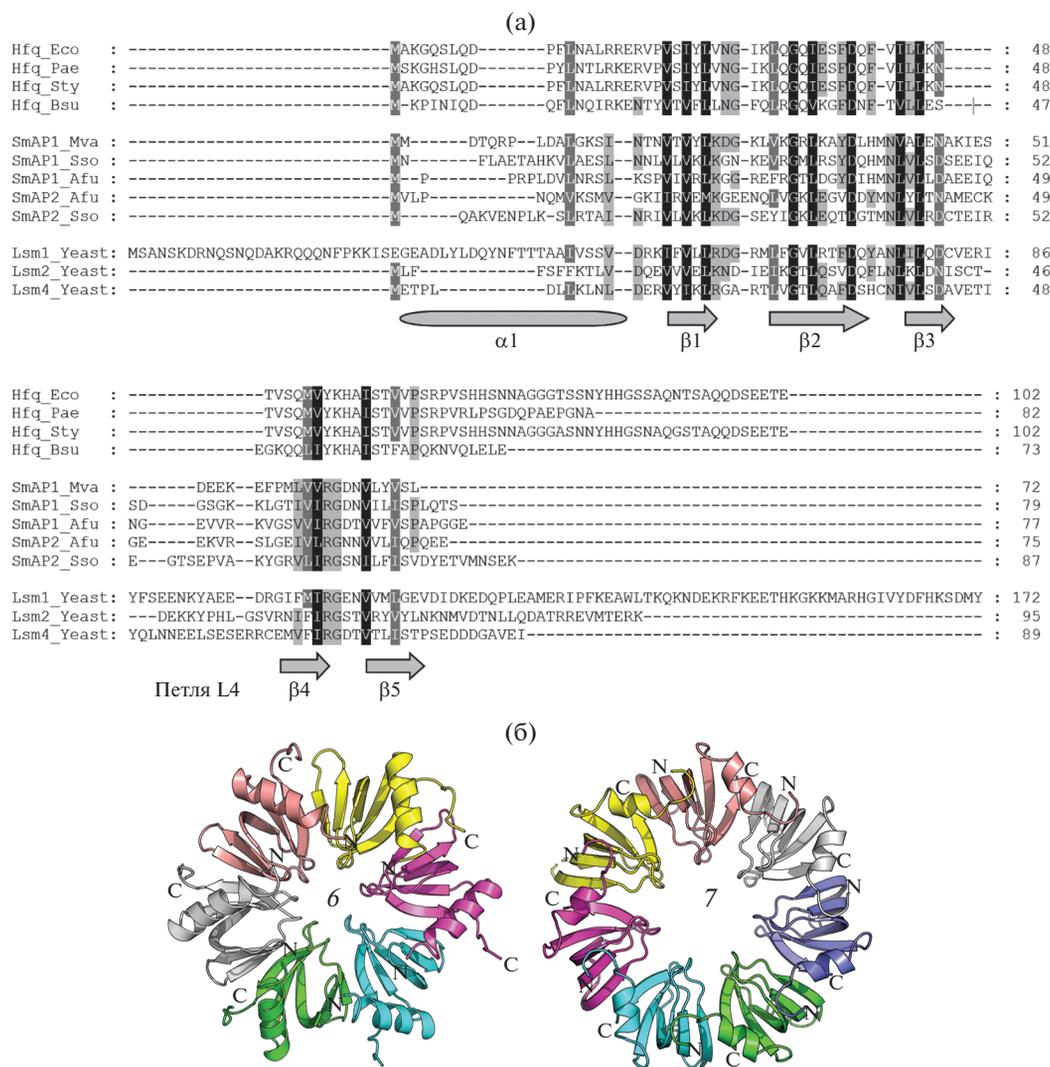


Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей представителей белков Hfq (Hfq_Eco – *E. coli*, Hfq_Pae – *P. aeruginosa*, Hfq_Sty – *Salmonella typhimurium*, Hfq_Bsu – *Bacillus subtilis*), SmAP (SmAP1_Mva – *Methanococcus vannielii*, SmAP1_Sso – *Sulfolobus solfataricus*, SmAP1-Afu – *Archeoglobus fulgidus*) и эукариотических Lsm из *Saccharomyces cerevisiae*. Внизу показаны элементы вторичной структуры, соответствующие аминокислотным последовательностям белков. Выравнивание сделано в программе T-Coffee с учетом информации по 3D-структурам белков (Espresso) [69] (a). Схематическое представление структур гексамерного бактериального белка Hfq из *P. aeruginosa* (слева, PDB ID 1U1S) и гептамерного архейного белка SmAP из *M. vannielii* (справа, PDB ID 5MK1). Вид со стороны α -спиралей мономеров белков (проксимальной стороны) (б).

5. СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИЦИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Энтеровирусы, а также некоторые родственные им вирусы инициируют синтез своих белков в зараженной эукариотической клетке посредством кэп-независимого механизма. В этом случае специфическая вторичная структура определенного участка вирусной мРНК (IRES) делает возможной сборку трансляционного аппарата непосредственно в месте, близком к старт-кодону. В отличие от кэп-зависимой инициации трансляции механизмы IRES-зависимой инициации весьма разнообразны. IRES из различных

источников могут быть абсолютно не похожи друг на друга: не найдено элемента структуры, общего для всех IRES, или какой-либо заметной гомологии, общей для всех их последовательностей. Такое разнообразие вызвало определенные трудности классификации IRES с момента их открытия. Однако интенсивные исследования вирусов, их мРНК и механизмов ее трансляции позволили к настоящему моменту выделить ряд общих черт, позволяющих вполне определенно отличать одни типы IRES от других.

Большинство вирусных IRES обладают стабильной вторичной и третичной структурами, способствующими их эффективному связыва-

нию с 40S субчастицей [51]. Инициация трансляции на всех исследованных на сегодняшний день IRES типа I зависит от наличия ITAF (англ. *IRES trans-acting factors*, представляют собой специальные факторы трансляции), список которых до сих пор полностью не определен. Одним из ITAFs, необходимых для эффективной инициации трансляции полиовирусной мРНК, является глицил-тРНК-синтетаза человека (**GlyRS**). Этот белок взаимодействует с апикальной частью домена V IRES полиовируса, которая мимикрирует под антикодонную шпильку глициновой тРНК и содержит глициновый антикодон. GlyRS имеет трехдоменную структуру, при этом за узнавание глицинового антикодона отвечает отдельный домен, называемый **ABD** (Anticodon Binding Domain). К настоящему моменту определены структуры GlyRS как в свободной форме, так и в комплексе с глициновой тРНК, что позволило детально изучить механизм узнавания белком антикодонной петли тРНК [52, 53], однако структура комплекса GlyRS с вирусной мРНК пока не определена.

Ранее были получены фрагменты домена V IRES первого типа (IRES I) и определен минимальный фрагмент, взаимодействующий с GlyRS [54]. Также было показано, что глицил-тРНК-синтетаза человека специфически связывает фрагменты IRES I вирусов, таксономически удаленных друг от друга, с близкими константами. Это указывает на универсальность механизма регуляции инициации трансляции при помощи глицил-тРНК-синтетазы для таких вирусов и на схожесть пространственных структур соответствующих участков их мРНК [55].

Сродство глицил-тРНК-синтетазы человека к фрагментам IRES I примерно в 3 раза превышает сродство к родственной тРНК [55], что дает основания предполагать схожий механизм взаимодействия белка и РНК в обоих случаях. В отличие от тРНК «антикодонная петля» в составе апикальной части пятого домена IRES содержит не пять, а шесть нуклеотидов. Пространственная структура V домена IRES I до сих пор неизвестна. Однако удалось построить теоретическую модель этого фрагмента и его комплекса с ABD доменом глицил-тРНК-синтетазы человека (рис. 5), основываясь на имеющейся структурной информации [56]. Модель имеет повышенное (по сравнению с гомологичной частью tRNA^{Gly}) число водородных связей с белком, что позволяет объяснить полученные нами биохимические данные.

6. СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕТЕРОТРИМЕРНОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2

У бактерий фактор инициации трансляции 2 (**IF2**) является шестидоменным мономерным

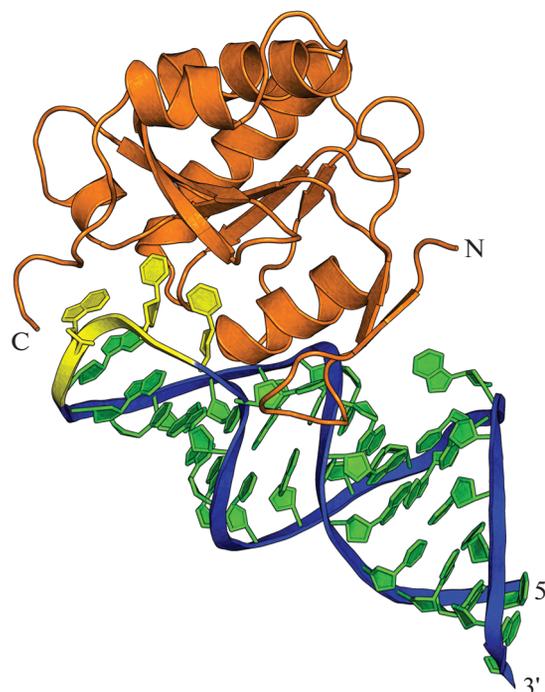


Рис. 5. Расчетная модель комплекса антикодон-связывающего домена глицил-тРНК-синтетазы человека с фрагментом IRES полиовируса.

белком, который способствует связыванию инициаторной аминоксил-тРНК с малой рибосомной субчастицей. У архей и эукариот фактор инициации трансляции 2 (**e/aIF2**) состоит из трех различных субъединиц: α , β , γ . Функционально он аналогичен бактериальному IF2, однако ни одна из субъединиц e/aIF2 не имеет гомологии с бактериальным IF2. Субъединицы эукариотического eIF2 по размеру больше, чем гомологичные им субъединицы архейного aIF2. В присутствии ГТФ гетеротримерный фактор e/aIF2 специфически узнает инициаторную Met-тРНК_i и образует с ней тройной комплекс e/aIF2–GTP–Met-тРНК_i. В такой форме e/aIF2 доставляет Met-тРНК_i в Р-участок малой рибосомной субчастицы, где за счет кодон-антикодонного взаимодействия происходит точное узнавание иницирующего кодона на мРНК с последующим гидролизом ГТФ. В комплексе с ГДФ фактор инициации трансляции IF2 покидает рибосому, после чего происходит обмен связанного ГДФ на ГТФ, и фактор снова способен образовывать прочный комплекс с Met-тРНК_i. Таким образом, фактор инициации трансляции IF2 выполняет очень важную функцию в клетке: запускает синтез белка на рибосоме.

Впервые структура гетеротримерного фактора инициации трансляции IF2 была определена в лаборатории ИБ РАН [57] и до настоящего времени она остается единственной кристаллической

структурой полноразмерного фактора инициации трансляции eIF2 эукариотического типа. Структура aIF2 была определена из термофильной археи *Sulfolobus solfataricus* и в дальнейшем использовалась для построения модели β -субъединицы эукариотического фактора eIF2 в составе пространственной структуры дрожжевого 48S преинициаторного комплекса (48S PIC), которая исследована методом криоэлектронной микроскопии [58]. Общими очертаниями гетеротримерный фактор инициации трансляции 2 напоминает английскую букву L и состоит из конформационно-стабильной центральной части и двух подвижных “крыльев” [57]. Минимальной и достаточной для связывания инициаторной Met-тРНК является конформационно-стабильная центральная часть aIF2 – γ -субъединица с третьим доменом α -субъединицы aIF2 α_{D3} γ .

Практически одновременно были расшифрованы две кристаллические структуры тройного комплекса aIF2–ГТФ–Met-тРНКi с использованием архейного фактора инициации трансляции IF2. В 2012 г. французская группа ученых получила кристаллы тройного комплекса, содержащего полноразмерный гетеротримерный фактор aIF2 $\alpha\beta\gamma$, однако построить и уточнить модель для подвижной β -субъединицы не удалось в силу недостаточно ясной электронной плотности [59]. В 2013 г. в лаборатории ИБ РАН были получены кристаллы тройного комплекса, содержащего коровую конформационно-стабильную часть фактора aIF2 α_{D3} γ [60]. Обе структуры тройного комплекса дали понимание того, как фактор aIF2 отличает инициаторную тРНК от элонгаторной тРНК. Инициаторная тРНК обращена к белку aIF2 своей D-стороной, тогда как фактор элонгации EF-Tu, структурно схожий с aIF2 γ , взаимодействует с элонгаторной тРНК по T-шпильке [61]. Таким образом, различия в нуклеотидной последовательности T-шпильки инициаторной и элонгаторных тРНК могут предотвращать связывание инициаторной тРНК с EF-Tu, а различия в D-шпильке могут предотвращать связывание элонгаторных тРНК с aIF2.

При сравнении двух структур тройного комплекса aIF2–ГТФ–Met-тРНКi было обнаружено, что несмотря на то, что в обеих структурах тРНК обращена к белку своей D-стороной, взаимодействует она с aIF2 несколько по-разному (рис. 6). В структуре тройного комплекса, полученной нашей группой, акцепторный стебель тРНК образует контакты со всеми тремя доменами γ -субъединицы и aIF2 α_{D3} : ССА-конец тРНК локализован в расщелине между G(I)- и III-доменами γ -субъединицы, II-домен γ -субъединицы aIF2 взаимодействует с 5'-концом Met-тРНКi, а белок aIF2 α_{D3} контактирует с локтем тРНК [60]. В модели aIF2–ГТФ–Met-тРНКi, полученной группой француз-

ских коллег [59], акцепторный стержень тРНК не взаимодействует с III-доменом γ -субъединицы, а локоть тРНК контактирует с aIF2 α_{D1} и aIF2 α_{D2} , которые согласно биохимическим данным проявляют неспецифическую РНК-связывающую активность [62, 63].

В сотрудничестве с лабораторией И. Шатского (НИИ ФХБ МГУ) в экспериментах *in vitro* показано, что архейный фактор aIF2 способен поддерживать рибосомное сканирование [64]. С помощью метода тоупринтинга выявили, что если добавить архейный фактор aIF2 в систему инициации трансляции млекопитающих, в которой отсутствует его эукариотический гомолог, то 48S инициаторный комплекс образуется, и идет сканирование мРНК в поисках иницирующего AUG-кодона. Эта совместная работа раскрыла особенность второй стадии инициации трансляции – присоединение большой субчастицы к 48S инициаторному комплексу. На этом этапе в работу включаются дополнительные факторы: eIF5 и eIF5B (промотируют присоединение большой субчастицы). У архей aIF5 отсутствует, но мы добавляли eIF5 в систему трансляции с архейным вторым фактором, и оказалось, что если заменить eIF2 на aIF2, то 80S рибосомный комплекс не образуется. Этот результат демонстрирует, что в археях способ стимуляции ГТФазной активности aIF2 отличается от того, который реализуется у эукариот.

Дальнейшие наши исследования в области архейного фактора aIF2 привели к тому, что был определен ряд пространственных структур γ -субъединицы aIF2, представляющих разные функциональные состояния этой рибосомной ГТФазы: от активного (ON) ГТФ-связанного до неактивного (OFF) ГДФ-связанного состояния, проходя через промежуточные формы, когда белок может быть связан одновременно с ГДФ и неорганическим фосфатом P_i или не содержать нуклеотида вовсе [65]. Сравнение структур впервые продемонстрировало смещение доменов II и III относительно домена G(I), хотя и не столь значительное как в его структурном гомологе, факторе элонгации трансляции EF-Tu. Скоординированные перестройки происходят и в петлях-переключателях Switch 1 и 2. Петля Switch 1 играет роль “застежки” для нуклеотид-связывающего кармана. Обнаружено, что конформация этого переключателя не позволяет полностью закрыть карман в aIF2 γ в отличие от EF-Tu. Он остается открытым на протяжении всего цикла работы aIF2 γ , и γ -фосфату ничто не препятствует покинуть белок после гидролиза ГТФ. Это в свою очередь указывает на возможность спонтанного гидролиза ГТФ у фактора aIF2 на рибосоме и объясняет отсутствие у архей фактора aIF5, стимулирующего ГТФазную активность aIF2.

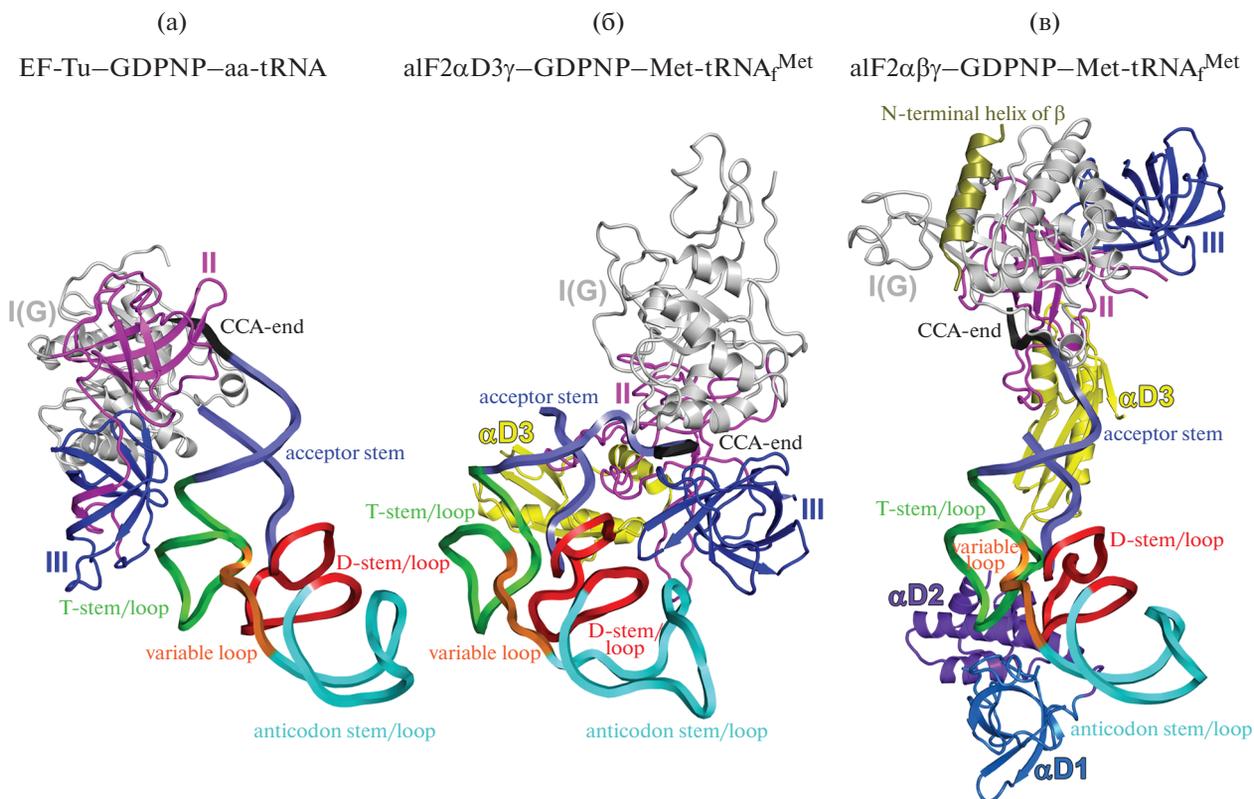


Рис. 6. Сравнение структур комплексов тРНК с EF-Tu (PDB ID 1TTT, слева), aIF2 α D3 γ (PDB ID 3QSY, в центре) и aIF2 α β γ (PDB ID 3V11, справа).

При анализе структуры aIF2 γ , нуклеотид-связывающий карман которой находится в состоянии интермедиата при переходе из ГТФ- в ГДФ-связанную форму, были обнаружены три кластера молекул воды, образующие водные мостики между γ -фосфатом ГТФ и двумя консервативными остатками Asp19 и Asp93 [66]. Эти водные мостики могут быть использованы для переноса протона, образующегося при каталитической реакции – гидролизе ГТФ.

Кроме этого, выявлена дополнительная петля (третья) у γ -субъединицы aIF2, которая может работать как переключатель во время гидролиза ГТФ [67]. В результате изменения конформации этой петли растворитель (молекулы воды) получает доступ к γ -фосфату ГТФ. Главным привратником на пути к γ -фосфату ГТФ является Met45. Интересно, что у эукариотической γ -субъединицы eIF2 вместо Met45 расположена более крупная аминокислота – изолейцин, и для открытия “ворот” требуется приложить усилия, чтобы не встретить стерические препятствия, что приводит к необходимости использовать белковый фактор eIF5, индуцирующий гидролиз ГТФ. А у фактора элонгации трансляции EF-Tu и вовсе отсутствует эта петля. В совокупности эти и изложенные выше данные лишней раз указывают на вероятность

отсутствия ГТФаза-активирующего фактора у архей и спонтанного гидролиза ГТФ у фактора aIF2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленный в Институте белка РАН опыт структурно-функциональных исследований РНК-белковых комплексов в рамках “рибосомного проекта” успешно использован при выполнении ряда исследований принципов регуляции трансляции и транскрипции функционально важными объектами. Среди них исследование авторегуляции трансляции универсально-консервативного рибосомного белка L1 в бактериях и археях, регулятора трансляции Hfq и его архейных гомологов, регуляторов транскрипции UxuR и ExuR, исследование дополнительной функции глицил-тРНК-синтетазы человека, изучение гетеротримерного фактора инициации трансляции IF2.

В обзоре кратко представлены результаты проведенных исследований. На молекулярном уровне показана природа различного родства рибосомного белка L1 к специфически узнаваемым участкам мРНК и рРНК, что позволяет регулировать трансляцию своего оперона по принципу обратной связи. Для белка Hfq выявлены структурные основы узнавания молекул РНК в функцио-

нально важном боковом РНК-связывающем участке белка. Исследованы РНК-связывающие свойства ряда архейных белков семейства Lsm и показаны существенные отличия их РНК-связывающих свойств по сравнению с бактериальным гомологом — белком Hfq. Получены структурные данные о взаимодействии глицил-тРНК-синтазы с IRES вирусов. Проведены обширные комплексные исследования гетеротримерного фактора инициации трансляции IF2 архей и эукариот.

Особую благодарность авторы выражают родоначальникам структурно-функциональных исследований в Институте белка РАН — Марии Борисовне Гарбер, Станиславу Владимировичу Нионову и Наталии Александровне Невской.

Работа выполнена при поддержке следующих фондов: проект “Регуляторные комплексы рибосомного белка L1 с мРНК” — Российский фонд фундаментальных исследований (РФФИ) (гранты № 03-04-48327, 04-04-49634, 05-04-48338, INTAS YSF № 04-83-3842); проект “Исследования РНК-связывающих свойств белка Hfq” — РФФИ (гранты № 04-04-48556, 07-04-00296, 13-04-00783); проект “Исследования РНК-связывающих свойств архейных Lsm белков” — Российский научный фонд (РНФ) (грант № 14-14-00496), РФФИ (грант № 18-04-00222); проект “Исследование функции регуляторов транскрипции UxuR и ExuR” — РНФ (грант № 18-14-00322); проект “Структурные и функциональные исследования глицил-тРНК-синтазы человека” — РНФ (грант № 15-14-00028), РФФИ (грант № 19-34-90135); проект “Структурные исследования гетеротримерного фактора инициации трансляции IF2” — РФФИ (грант № 18-04-01331).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gourse R.L., de Boer H.A., Nomura M. // Cell. 1986. V. 44. № 1. P. 197.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90498-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90498-8)
- Михайлина А.О., Костарева О.С., Нионова Е.Ю. и др. // Молекулярная биология. 2018. Т. 52. № 1. С. 98.
<https://doi.org/10.7868/S0026898418010135>
- Mayer C., Köhrer C., Gröbner P., Piendl W. // Mol. Microbiol. 1998. V. 27. № 2. P. 455.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00693.x>
- Hanner M., Mayer C., Köhrer C. et al. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. № 2. P. 409.
<https://doi.org/10.1128/jb.176.2.409-418.1994>
- Tishchenko S.V., Vassilieva J.M., Platonova O.B. et al. // Biochem. 2001. V. 66. № 9. P. 948.
<https://doi.org/10.1023/a:1012353122174>
- Ennifar E., Nikulin A., Tishchenko S. et al. // J. Mol. Biol. 2000. V. 304. № 1. P. 35.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4204>
- Nevskaya N., Tishchenko S., Gabdulkhakov A. et al. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 2. P. 478.
<https://doi.org/10.1093/nar/gki194>
- Nevskaya N., Tishchenko S., Volchkov S. et al. // J. Mol. Biol. 2006. V. 355. № 4. P. 747.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.084>
- Tishchenko S., Nikonova E., Nikulin A. et al. // Acta Cryst. D. 2006. V. 62. (Pt. 12). P. 1545.
<https://doi.org/10.1107/S0907444906041655>
- Nikulin A., Eliseikina I., Tishchenko S. et al. // Nat. Struct. Biol. 2003. V. 10. № 2. P. 104.
<https://doi.org/10.1038/nsb886>
- Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Nevskaya N. et al. // Acta Cryst. D. 2012. V. 68. (Pt. 8). P. 1051.
<https://doi.org/10.1107/S0907444912020136>
- Kostareva O., Tishchenko S., Nikonova E. et al. // J. Mol. Recognit. 2011. V. 24. № 4. P. 524.
<https://doi.org/10.1002/jmr.1063>
- Tishchenko S., Kostareva O., Gabdulkhakov A. et al. // Acta Cryst. D. 2015. V. 71. (Pt. 2). P. 376.
<https://doi.org/10.1107/S1399004714026248>
- Костарева О.С., Невская Н.А., Тищенко С.В. и др. // Молекулярная биология. 2018. Т. 52. № 1. С. 106.
<https://doi.org/10.7868/S0026898418010147>
- Tishchenko S., Nikonova E., Kljashtorny V. et al. // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. № 21. P. 7389.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm898>
- Tishchenko S., Kljashtorny V., Kostareva O. et al. // J. Mol. Biol. 2008. V. 383. № 2. P. 301.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.058>
- Korepanov A.P., Kostareva O.S., Bazhenova M.V. et al. // Protein J. 2015. V. 34. № 2. P. 103.
<https://doi.org/10.1007/s10930-015-9602-5>
- Updegrove T.B., Zhang A., Storz G. // Curr. Opin. Microbiol. 2016. V. 30. P. 133.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.003>
- de Fernandes M.T.F., Hayward W.S., August T.J. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 3. P. 824.
- Schuppli D., Miranda G., Tsui H.C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. V. 94. № 19. P. 10239.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10239>
- Vecerek B., Moll I., Afonyushkin T. et al. // Mol. Microbiol. 2003. V. 50. № 3. P. 897.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03727.x>
- Muffler A., Traulsen D.D., Fischer D. et al. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 1. P. 297.
<https://doi.org/10.1128/JB.179.1.297-300.1997>
- Jørgensen M.G., Pettersen J.S., Kallipolitis B.H. // Biochim. Biophys. Acta — Gene Regul. Mech. 2020. V. 1863. № 5. P. 194504.
<https://doi.org/10.1016/j.bbgrm.2020.194504>
- Schumacher M.A., Pearson R.F., Möller T. et al. // EMBO J. 2002. V. 21. № 13. P. 3546.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdf322>
- Sauter C., Basquin J., Suck D. // Nucl. Acids Res. 2003. V. 31. № 14. P. 4091.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg480>
- Nikulin A., Stolboushkina E., Perederina A. et al. // Acta Cryst. D. 2005. V. 61. (Pt. 2). P. 141.
<https://doi.org/10.1107/S0907444904030008>
- Arлуison V., Mutyam S.K., Mura C. et al. // Protein Sci. 2007. V. 16. № 9. P. 1830.
<https://doi.org/10.1110/ps.072883707>
- Murina V., Lekontseva N., Nikulin A. // Acta Cryst. D. 2013. V. 69. (Pt. 8). P. 1504.
<https://doi.org/10.1107/S090744491301010X>

29. *Nemchinova M., Balobanov V., Nikonova E. et al.* // *Protein J.* 2017. V. 36. № 3. P. 157.
<https://doi.org/10.1007/s10930-017-9709-y>
30. *Balobanov V., Lekontseva N., Mikhaylina A., Nikulin A.* // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2113. P. 251.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0278-2_17
31. *Chen J., Morita T., Gottesman S.* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019. V. 9. № 6. P. 201.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00201>
32. *Sauer E., Schmidt S., Weichenrieder O.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. V. 109. № 24. P. 9396.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1202521109>
33. *Robinson K.E., Orans J., Kovach A.R. et al.* // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 42. № 4. P. 2376.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1171>
34. *Panja S., Schu D.J., Woodson S.* // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 15. P. 7536.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt521>
35. *Мурина В.Н., Никулин А.Д.* // *Успехи биологической химии.* 2011. Т. 51. С. 133.
36. *Fischer S., Benz J., Spath B. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 45. P. 34429.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118950>
37. *Maier L.K., Benz J., Fischer S. et al.* // *Biochimie.* 2015. V. 117. P. 129.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.02.023>
38. *Märtenz B., Bezerra G., Kreuter M. et al.* // *Life.* 2015. V. 5. № 2. P. 1264.
<https://doi.org/10.3390/life5021264>
39. *Märtenz B., Hou L., Amman F. et al.* // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 13. P. 7938.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx437>
40. *Nikulin A., Mikhailina A., Lekontseva N. et al.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017. V. 35. № 8. P. 1615.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1189849>
41. *Lekontseva N., Mikhailina A., Fando M. et al.* // *Biochimie.* 2020. V. 175. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.001>
42. *Ashwell G.* // *Methods Enzymol.* 1962. V. 5. P. 190.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(62\)05205-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(62)05205-2)
43. *Peekhaus N., Conway T.* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 14. P. 3495.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.14.3495-3502.1998>
44. *Ritzenthaler P., Blanco C., Mata-Gilsinger M.* // *Mol. Gen. Genet.* 1985. V. 199. № 3. P. 507.
<https://doi.org/10.1007/BF00330766>
45. *Utz C.B., Nguyen A.B., Smalley D.J. et al.* // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 22. P. 7690.
<https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7690-7696.2004>
46. *Suvorova I.A., Tutukina M.N., Ravcheev D.A. et al.* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. № 15. P. 3956.
<https://doi.org/10.1128/JB.00277-11>
47. *Fillenberg S.B., Friess M.D., Korner S. et al.* // *PLoS One* 2016. V. 11. № 6. P. e0157691.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157691>
48. *Tutukina M.N., Potapova A.V., Vlasov P.K. et al.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016. V. 34. № 10. P. 2296.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1115779>
49. *Bessonova T.A., Lekontseva N.V., Shvyreva U.S. et al.* // *Protein Expr. Purif.* 2019. V. 161. P. 70.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.05.001>
50. *Пуртов Ю.А., Тутукина М.Н., Никулин А.Д., Озо-льинь О.Н.* // *Биофизика.* 2019. Т. 64. № 1. С. 061.
<https://doi.org/10.1134/S0006350919010160>
51. *Nikonov O.S., Chernykh E.S., Garber M.B., Nikonova E.Y.* // *Biochemistry (Moscow).* 2017. V. 82. № 13. P. 1615.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917130041>
52. *Qin X., Hao Z., Tian Q. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 29. P. 20359.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557249>
53. *Qin X., Deng X., Chen L., Xie W.* // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 18. P. 3603.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.018>
54. *Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Леконцева Н.В. и др.* // *Биофизика.* 2016. Т. 61. № 2. С. 277.
<https://doi.org/10.1134/S0006350916020135>
55. *Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Немчинова М.С. и др.* // *Молекулярная биология.* 2018. Т. 52. № 1. С. 10.
<https://doi.org/10.7868/S0026898418010020>
56. *Никонов О.С., Немчинова М.С., Кляшторный В.Г. и др.* // *Молекулярная биология.* 2018. Т. 52. № 1. С. 112.
<https://doi.org/10.7868/S0026898418010159>
57. *Stolboushkina E., Nikonov S., Nikulin A. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 3. P. 680.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.039>
58. *Llácer J.L., Hussain T., Marler L. et al.* // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. № 3. P. 399.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.033>
59. *Schmitt E., Panvert M., Lazennec-Schurdevin C. et al.* // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 4. P. 450.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2259>
60. *Stolboushkina E., Nikonov S., Zelinskaya N. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. № 6. P. 989.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.12.023>
61. *Nissen P., Kjeldgaard M., Thirup S.r. et al.* // *Science.* 1995. V. 270. № 5241. P. 1464.
<https://doi.org/10.1126/science.270.5241.1464>
62. *Yatime L., Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 16. P. 15984.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M311561200>
63. *Pedulla N.* // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 6. P. 1804.
<https://doi.org/10.1093/nar/gki321>
64. *Dmitriev S.E., Stolboushkina E.A., Terenin I.M. et al.* // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 413. № 1. P. 106.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.026>
65. *Nikonov O., Stolboushkina E., Arkhipova V. et al.* // *Acta Cryst. D.* 2014. V. 70. (Pt. 3). P. 658.
<https://doi.org/10.1107/S1399004713032240>
66. *Nikonov O., Kravchenko O., Arkhipova V. et al.* // *Biochimie.* 2016. V. 121. P. 197.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.029>
67. *Nikonov O., Kravchenko O., Nevskaya N. et al.* // *Acta Cryst. D.* 2019. V. 75. (Pt. 4). P. 392.
<https://doi.org/10.1107/S20597983190002304>
68. *Link T.M., Valentin-Hansen P., Brennan R.G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 46. P. 19292.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908744106>
69. *Notredame C., Higgins D.G., Heringa J.* // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. № 1. P. 205.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>