

УДК 577.321

## БИОСИНТЕЗ И МЕХАНИЗМ ВСТРАИВАНИЯ СЕЛЕНОЦИСТЕИНА В СИНТЕЗИРУЕМЫЕ БЕЛКИ

© 2013 г. Е. Г. Варламова\*, М. В. Гольтяев, С. В. Новосёлов, В. И. Новосёлов, Е. Е. Фесенко

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Московская область, 142290

Поступила в редакцию 02.11.2012 г.

Принята к печати 31.01.2013 г.

Универсальный генетический код предусматривает возможность кодирования только 20 канонических аминокислот, тогда как 21-я аминокислота – селеноцистеин (Sec), кодируется стоп-кодоном UGA. Селеноцистеин представляет исключительный интерес для молекулярных биологов, поскольку механизм его встраивания в синтезируемые белки существенно отличается от механизма встраивания других аминокислот. В этом процессе принимают участие такие *cis*- и *trans*-активные факторы, как SECIS-элемент (Selenocystein insertion sequence). У эукариот SECIS-элемент локализуется в 3'-нетранслируемой области мРНК, а у бактерий он находится внутри открытой рамки считывания сразу за селеноцистеиновым UGA-кодоном, что обуславливает отличия в механизме встраивания селеноцистеина в этих доменах жизни. К транс-факторам относятся Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>, обладающая уникальной системой биосинтеза, Sec-специфичный фактор элонгации EFsec и Sec-связывающий белок SBP2. Таким образом, для встраивания селеноцистеина в синтезируемый белок клетка должна содержать большое количество дополнительных молекул, что делает селеноцистеин-содержащие белки достаточно “дорогими” и подчеркивает их особенную роль в метаболизме.

**Ключевые слова:** селеноцистеин, SECIS-элемент, SBP2, Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>.

**BIOSYNTHESIS AND MECHANISM OF SELENOCYSTEINE INCORPORATION INTO SYNTHESIZED PROTEINS**, by E. G. Varlamova\*, M. V. Goltyaev, S. V. Novoselov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko (Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142292; \*e-mail: lenvarlamova@rambler.ru). Universal genetic code provides the ability to encode only twenty “canonical” amino acids, whereas the twenty first amino acid – selenocysteine (Sec), is encoded by one of three well-known stop codon (UGA). In terms of molecular biology, selenocysteine is of exceptional interest, the mechanism of its incorporation into synthesized polypeptide chains is very different from that of the other typical 20 amino acids. This process involves some *cis*- and *trans*-active factors, such as the SECIS element (Selenocystein insertion sequence), a structure located in the 3'-untranslated region of eukaryotic mRNA, and in the open reading frame immediately after the UGA-selenocysteine codon in bacteria, which, in turn, leads to differences in the mechanism of selenocysteine incorporation in these domains of life. The *trans*-factors include Sec-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> that has a unique system of biosynthesis, Sec-specific elongation factor EFsec and SBP2 – Sec binding protein. Thus, for realization of the selenocysteine incorporation process during translation a large number of additional molecules must be synthesized in the cell, this fact makes the selenocysteine containing proteins rather “expensive” and emphasizes their crucial role in metabolism.

**Keywords:** selenocysteine, SECIS element, SBP2, Sec tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>.

DOI: 10.7868/S0026898413040137

Селеноцистеин (Sec) – уникальная аминокислота, представленная во всех доменах жизни, кодируется терминирующим, или стоп-кодоном

UGA [1–3]. Только 100 (20%) из 500 секвенированных геномов эубактерий кодируют *cis*- и *trans*-активные элементы, участвующие в про-

Принятые сокращения: Sec (Selenocysteine) – селеноцистеин; SECIS (SelenoCystein Insertion Sequence) – вторичная структура мРНК, необходимая для встраивания Sec в белки; Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> – селеноцистеиновая тРНК; SBP2 (SECIS Binding Protein 2) – SECIS-связывающий белок 2; EFsec (Elongation Factor of selenocysteine) – селеноцистеиновый фактор элонгации; SelA – селеноцистеинсинтаза прокариот; SelS – селеноцистеинсинтаза эукариот; SPS1 и SPS2 (SelenoPhosphate Synthetase) – селенофосфатсинтаза 1 и 2 эукариот; SelD – селенофосфатсинтаза бактерий; SelB – селеноцистеин-специфичный фактор элонгации; PSTK (O-Phosphoseryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> Kinase) – фосфосерил-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>-киназа; GPx1 (Glutathione Peroxidase 1) – глутатионпероксидаза 1; GPx4 (Glutathione Peroxidase 4) – глутатионпероксидаза 4; SID (Sec Incorporation Domain) – домен, способствующий встраиванию селеноцистеина; RBD (RNA Binding Domain) – РНК-связывающий домен.

\* Эл. почта: lenvarlamova@rambler.ru

цессе встраивания Sec в белки, у архей доля таких геномов составляет приблизительно 10%. Механизм встраивания Sec функционирует у таких низших эукариот, как зеленые водоросли, кинетопластыды и миксомицеты, а также у большинства высших эукариот, за исключением грибов и растений [4, 5].

Чтобы UGA-кодон считывался как селеноцистеиновый, и при синтезе селен-содержащих белков не происходило преждевременной терминации трансляции, в клетке существует уникальный механизм, включающий цис- и транс-активные факторы. В число этих факторов входят: SECIS-элемент – элемент вторичной структуры, расположенный в 3'-нетранслируемой области эукариотических мРНК, и внутри открытой рамки считывания сразу за UGA-кодоном – у бактерий; Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>, для которой характерна уникальная система биосинтеза; Sec-специфичный фактор элонгации EFsec и SBP2 – Sec-связывающий белок [6–8]. Механизм биосинтеза селеноцистеина у эубактерий был описан еще в начале 1990-х гг. [9–11], однако только в последние несколько лет его удалось понять и изучить у представителей двух других доменов жизни [12].

### БИОСИНТЕЗ СЕЛЕНОЦИСТЕИНА В ТРЕХ ДОМЕНАХ ЖИЗНИ

Фермент, синтезирующий Sec, называется Sec-синтазой (у эубактерий он кодируется геном *selA*, у эукариот и архей – *secS*). Sec-синтаза – пиридоксальфосфат-зависимый белок, который взаимодействует с сериновой тРНК (Ser-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>) и катализирует перенос гидроксильной группы с серина на аминокрилиловый посредник (аминокрилиловая (дегидроаланиловая)-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>). Этот посредник служит акцептором активного донора селена, которым, как показано на примере эубактерий, является моноселенофосфат [10–12]. После ряда последовательных реакций образуется

Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>. Активация селена происходит в результате фосфорилирования селенида при участии АТФ и селенофосфатсинтазы (SPS), у эубактерий известной как SelD [13, 14]. Таким же образом синтезируется Sec у эукариот и архей, за исключением дополнительного этапа, а именно, биосинтеза О-фосфосерил-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> в присутствии фосфосерил-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>-киназы (PSTK). Кроме того, у эукариот донором селена (селенофосфата) в данных реакциях служит белок SPS2 [6–8, 12, 15–17]. Схематически процесс биосинтеза Sec у эукариот [12] представлен на рис. 1.

### ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ СЕЛЕНОЦИСТЕИНОВОЙ ТРНК (SEC-ТРНК<sup>[SER]SEC</sup>)

Ключевым транс-активным фактором в процессе биосинтеза Sec является Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> [18], структура, которой имеет свои особенности. Так, вторичная структура Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> млекопитающих представлена двумя “разновидностями” типа клеверного листа: 9/4 и 7/5, в зависимости от количества спаренных оснований в акцепторном стебле (9 или 7) и псевдоуридиновой петле (ТΨС) (4 или 5). Относительно недавно показали, что для бактерий характерна форма 8/5 Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> [19, 20].

Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> – самая длинная эукариотическая тРНК. Она состоит из 90 н. и содержит нетипично длинную переменную петлю, а также дополнительный нуклеотид в псевдоуридиновой петле. У *Escherichia coli* длина Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> равна 95 н. В состав Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> входят от 15 до 17 модифицированных оснований [21–23].

Необычен и механизм транскрипции этой тРНК, которая начинается с первого нуклеотида кодирующей последовательности, а не с 5'-лидерной, что характерно для других тРНК [24]. В геноме позвоночных, за исключением *Danio rerio* [25], ген, кодирующий Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>, представлен

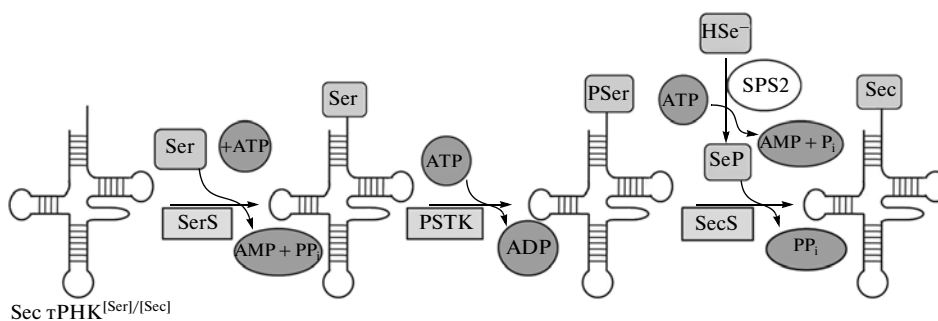


Рис. 1. Механизм биосинтеза селеноцистеина у эукариот.

единственной копией, состоящей из 87 п.н. Терминирующая ССА-последовательность присоединяется посттранскрипционно [3].

Клетки млекопитающих содержат две основные изоформы Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>, отличающиеся друг от друга наличием метильной группы в позиции 34 антикодоновой петли, присоединением которой заканчивается процесс созревания тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> [23].

### СТРУКТУРА SECIS-ЭЛЕМЕНТА

SECIS-элемент — цис-активный фактор, участвующий во встраивании Sec в белки. Этот элемент содержит три консервативных участка: коровую часть, или квартет SECIS-элементов с мотивом RUGA (где R = A или G); внешнюю петлю с AAR-последовательностью; и пару неканонических оснований GA на 3'-конце, в связи с чем SECIS-элемент был отнесен к классу структур РНК с мотивом K-turn (kink-turn — петля-поворот). Этот мотив представлен спаренными и одноцепочечными участками РНК, организованными вокруг двух неканонических пар, как правило GA. K-turn-мотив обнаружен в рРНК [26], малых ядерных РНК [27], различных мРНК [28, 29].

По структуре внешней (апикальной) петли выделяют две группы SECIS-элементов — типа I и типа II. К первому типу относятся SECIS-элементы, содержащие спиральные участки 1 и 2 (helix1, helix2), внутреннюю петлю (internal loop) и внешнюю петлю (apical loop) с AAR-мотивом на 5'-конце. Внешняя петля SECIS-элементов типа II имеет дополнительную петлю и третий спаренный участок [30]. Большая часть SECIS-элементов относится именно к типу II [31].

Схематически структура SECIS-элементов первой и второй групп представлена на рис. 2.

К настоящему времени открытым остается вопрос о функциональной роли мотива AAR. Учитывая достаточно высокую консервативность этого мотива, предположили, что он, скорее всего, взаимодействует с белковым фактором. Однако эта идея была поставлена под сомнение, поскольку SECIS-элементы мРНК двух селен-содержащих белков человека (SelO и SelM) содержат неспаренные остатки цитозина вместо AAR-мотива [32–35]. Кроме того, замена остатков цитозина в этой последовательности на аденин не снижала эффективность встраивания Sec в белки, тогда как при замене остатков цито-

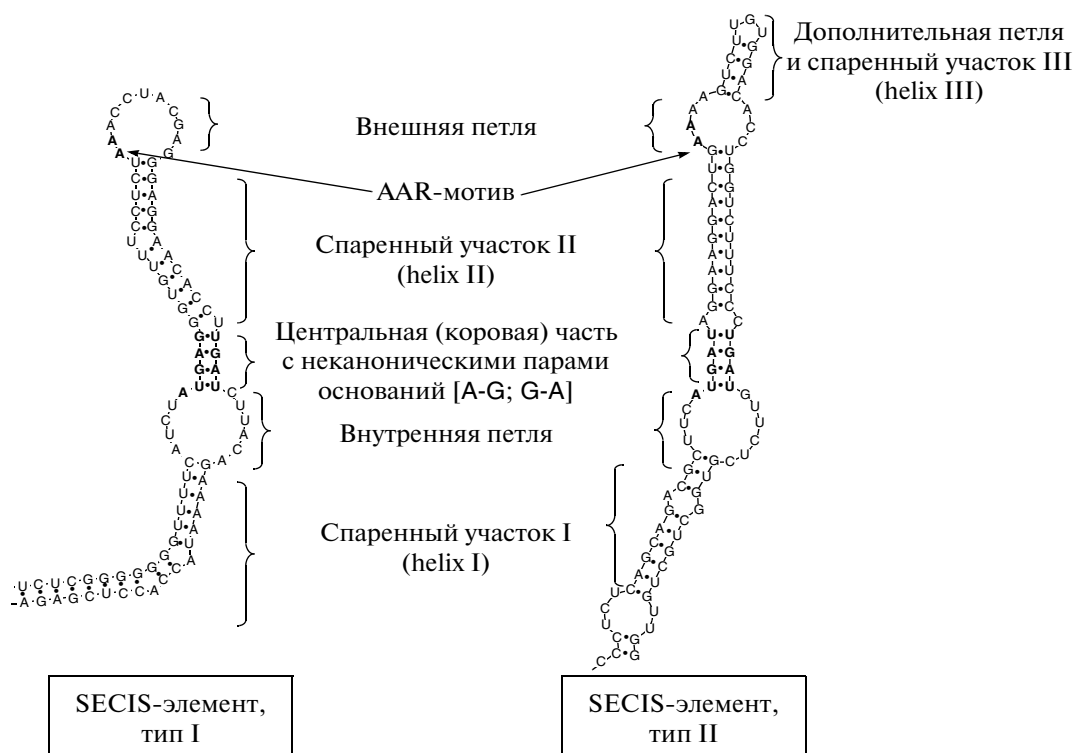


Рис. 2. Структура двух типов SECIS-элементов млекопитающих, построенная с помощью программы SECISerch 2.0. (<http://genome.unl.edu/SECISearch.html>) [33].

зина на урацил или гуанидин наблюдалась обратная ситуация [34].

SECIS-элемент находится в 3'-нетранслируемой области мРНК селен-содержащих белков эукариот и архей [36, 37], тогда как у бактерий этот элемент локализован в кодирующей области, непосредственно за UGA-кодоном. У вирусов SECIS-элемент может находиться как в 3'-нетранслируемой области (ген вируса контагиозного моллюска, *Molluscum contagiosum virus*), так и в кодирующей области, что характерно для генов *gpx4* вируса оспы домашней птицы (*Fowlpox virus*) и вируса оспы канареек (*Canarypox virus*), кодирующего белок, высокоомологичный GPx4 *Fowlpox virus*, но в нем Sec замещен на Cys [38, 39]. Подобное “перемещение” SECIS-элементов в 3'-нетранслируемую область мРНК генов селен-содержащих белков объясняют тем, что процессы транскрипции и трансляции у эукариот разобщены во времени и пространстве. Известно, что хеликазы нарушают вторичную структуру РНК, ингибируя тем самым связывание SECIS-элементов с SBP-белками, поэтому сопряженность процессов транскрипции и трансляции у прокариот приводит к тому, что для встраивания Sec необходимо, чтобы SECIS-элемент находился в кодирующей области мРНК. Это подтверждается экспериментальными данными о том, что встраивание SECIS-элементов вирусов в кодирующую область мРНК селен-содержащих белков млекопитающих сильно снижает их экспрессию [33].

Ввиду того, что в состав SECIS-элементов входят консервативные участки, анализ их структурных и термодинамических особенностей используют для идентификации генов селен-содержащих белков *in silico* при помощи программ SECISearch 1.0, geneid [40, 41], SECISearch 2.0, SECISblastn (<http://genome.unl.edu/SECISearch.html>) [33]. В настоящее время создана база данных SelenoDB 1.0 (<http://www.selenodb.org/>) [42], содержащая информацию о генах селен-содержащих белков эукариот, структуре SECIS-элементов, что крайне необходимо для правильного аннотирования этих генов, число которых постоянно возрастает.

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА SBP2

В 1991 г. обнаружили эукариотический SECIS-элемент [43], что дало основание для проведения поиска связывающихся с ним факторов, в результате которого из экстракта семенников крысы выделили SBP2 [44]. SBP2 — это белок с молекулярной массой 94 кДа, специфично взаимодействующий либо с SECIS-элементом в области квартета, либо с предшествующей ему последовательностью с образованием комплекса SBP2-SECIS [45].

Структурно-функциональный анализ выявил в SBP2 три основных домена: N-концевой домен (аминокислотные остатки 1–399), найденный только у высших эукариот, содержит сигнал ядерной локализации; центральный функциональный домен SID (Sec Incorporation Domain, аминокислотные остатки 399–517) необходим для связывания Sec и SECIS-элемента, мутации в нем приводят к снижению эффективности связывания SBP2 с рибосомами; С-концевой РНК-связывающий домен RBD (RNA Binding Domain, аминокислотные остатки 517–777) с консервативной последовательностью L7AeRNA, необходимой для взаимодействия с 28S рРНК [45, 46]. SBP2 взаимодействует с SECIS-элементом посредством RBD, однако этот механизм понятен не до конца [7, 47, 48]. Показано, что для того, чтобы SBP2 осуществлял встраивание Sec и мог связывать рибосомы, достаточно только SID и RBD. Кроме того, у большинства беспозвоночных SBP2 состоит только из этих доменов и не имеет N-концевого домена [46, 47].

Одна из наиболее вероятных функций SBP2 — прямое/опосредованное участие в связывании SECIS-элемента с фактором элонгации eEFSec, что способствует продвижению Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup> по рибосоме [3]. Сформировавшийся комплекс SECIS-SBP2-28S рРНК-eEFsec взаимодействует с Sec-тРНК<sup>[Ser]Sec</sup>, что приводит к встраиванию селеноцистеина в растущий полипептид напротив UGA-кодона [47, 48].

### ФАКТОР ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eEFSEC

Эукариотический фактор элонгации трансляции eEF1A доставляет на А-сайт рибосомы аминоксил-тРНК, после чего при участии eEF1A происходит гидролиз GTP до GDP и фосфата, а выделяющаяся энергия расходуется на сближение двух акцепторных концов молекул тРНК с прикрепленными к ним аминокислотными остатками.

eEF1A состоит из трех доменов. Первый связывается непосредственно с рибосомой и обладает GTPазной активностью. Второй домен вовлечен во взаимодействие с аминоксил-тРНК и фактором элонгации трансляции eEF1B $\alpha$  [49], что в значительной степени отличается от бактериальной системы, в которой третьим доменом фактора элонгации трансляции EF-Tu является сайт связывания с фактором EF-Ts. Третий домен eEF1A изучен к настоящему времени недостаточно. Известно, что он может неспецифически взаимодействовать с псевдоуридиловой петлей аминоксил-тРНК, что характерно и для EF-Tu [50].

Поиск Sec-специфичных факторов элонгации у эукариот по гомологии с eEF1A и SelB архей был проведен независимо двумя группами ученых [50]. При помощи множественного выравнивания показали, что eEFSec обладает доменной структурой, близкой к структуре eEF1A, но имеет дополнительный С-концевой домен IV, необходимый для взаимодействия с белком SBP2 [51–53]. Оказалось, что eEFSec связывается с Sec-тРНК<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, но не с ее предшественником — Ser-тРНК<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. Подобно другим факторам трансляции eEFSec является GTP-связывающим белком. Показано также, что eEFSec обладает более высоким сродством к GTP, чем к GDP [52, 54].

### РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК L30, НУКЛЕОЛИН И ФАКТОР ИНИЦИИИ ТРАНСЛЯЦИИ 4a3 (eIF4a3)

Роль белка L30, специфичного для эукариот и архей, в процессе трансляции к настоящему времени не совсем ясна. Известно, что L30 вовлечен в биосинтез селен-содержащих белков [55]. В условиях *in vivo* и *in vitro* L30 конкурирует с SBP2 за связывание с SECIS-РНК. Эти наблюдения позволили предположить, что L30 способен перемещать SBP2, связанный с SECIS-элементом, на А-сайт рибосомы. Показано также, что белок L30, локализующийся между большой и малой субъединицами 80S рибосомы, располагается в участке, удаленном от А-сайта [56].

Белок нуклеолин входит в состав ядрышкового организатора. Нуклеолин связывается с рРНК и рибосомными белками и участвует в сборке рибосом. Нуклеолин принимает участие в биосинтезе селен-содержащих белков (Gpx1), действуя, скорее всего, как Sec-специфичный фактор элонгации (подобно прокариотическому SelB). При этом нуклеолин взаимодействует с ДНК-связывающим белком В [57, 58], в структуру которого входят четыре аргинин-богатых участка, что характерно для РНК-связывающих белков, он также специфично взаимодействует с SECIS-элементом Gpx1. Однако в отличие от SBP2, белок В не способен связываться с Sec-тРНК<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> и не обладает GTPазной активностью подобно SelB. Таким образом, для трансляции некоторых эукариотических селен-содержащих белков (в частности Gpx1 человека), по-видимому, необходимы такие дополнительные факторы, как нуклеолин, который выступает в качестве SelB у прокариот, и ДНК-связывающий белок В, действующий подобно SBP2 [58].

Эукариотический фактор инициации трансляции 4a3 (eIF4a3) относится к РНК-зависимым АТРамам семейства белков с DEAD-боксом [59]. Основная функция eIF4a3 — связывание с мРНК

в процессе сплайсинга в участке, удаленном на 20–24 п.н. от точки сплайсинга [60–63]. В условиях дефицита селена eIF4a3 действует также как транскрипт-специфичный репрессор трансляции мРНК селен-содержащих белков. При недостатке данного микроэлемента в клетках увеличивается количество eIF4a3, который селективно ингибирует синтез некоторых селен-содержащих белков. eIF4a3 может связываться с SECIS-элементами мРНК Gpx1 и метионин-R-сульфоксидредуктазы (MsrB1, она же SelR и SelX), но не с SECIS-элементами Gpx4 и тиоредоксинредуктазы 1 (TrxR1) [64]. В связи с этим первоначально предположили, что Gpx1 и MsrB1 не входят в число жизненно необходимых селен-содержащих белков, тем более что фенотипические изменения, вызванные нарушениями в структуре генов этих белков, незначительны [65–71]. Напротив, гены, кодирующие Gpx4 и TrxR1, входят в число генов “домашнего хозяйства”. Животные с нокаутом этих генов погибают на ранних стадиях эмбрионального развития [72, 73]. Однако относительно недавно идентифицировали еще две мишени eIF4a3 — селен-содержащие белки DIO1 и SelN. Нарушение структуры генов этих белков, как и в случае Gpx1 и MsrB1, не приводит к летальному эффекту. В то же время, eIF4a3 не связывается с SECIS-элементами в мРНК важных редокс-белков SelW и SelT [74–77].

Используя биохимические и биофизические подходы, в структуре SECIS идентифицировали три участка, необходимых для формирования комплекса eIF4a3-SECIS: внутреннюю петлю, внешнюю петлю и урацил, локализованный близ коровой части со стороны 3'-конца. Кинетические исследования показали, что внутренняя петля необходима для узнавания eIF4a3, внешняя петля и урацил — для формирования стабильного комплекса. Структурный анализ SECIS-элементов восьми селен-содержащих белков (TrxR1, Gpx4, DIO1, SelN, Gpx1, MsrB1, SelW и SelT) подтвердил данные о том, что eIF4a3 связывается преимущественно с SECIS-элементами типа I, содержащими консервативный урацил вблизи коровой части. Замена урацила в положении 54 (U54) SECIS-элемента Gpx1 на цитозин привела к снижению эффективности формирования комплекса eIF4a3-SECIS приблизительно в 90 раз [78].

Известно, что белок SBP2 не может связываться с SECIS-элементом, когда SECIS находится в комплексе с eIF4a3, поскольку участок связывания eIF4a3 во внутренней петле SECIS перекрывается с участком связывания SBP2 [64, 78]. Структурно eIF4a3, подобно всем представителям семейства белков с DEAD-боксом, включая eIF4a1, представляет собой два домена, соединенных подвижным линкером [79, 80]. Как

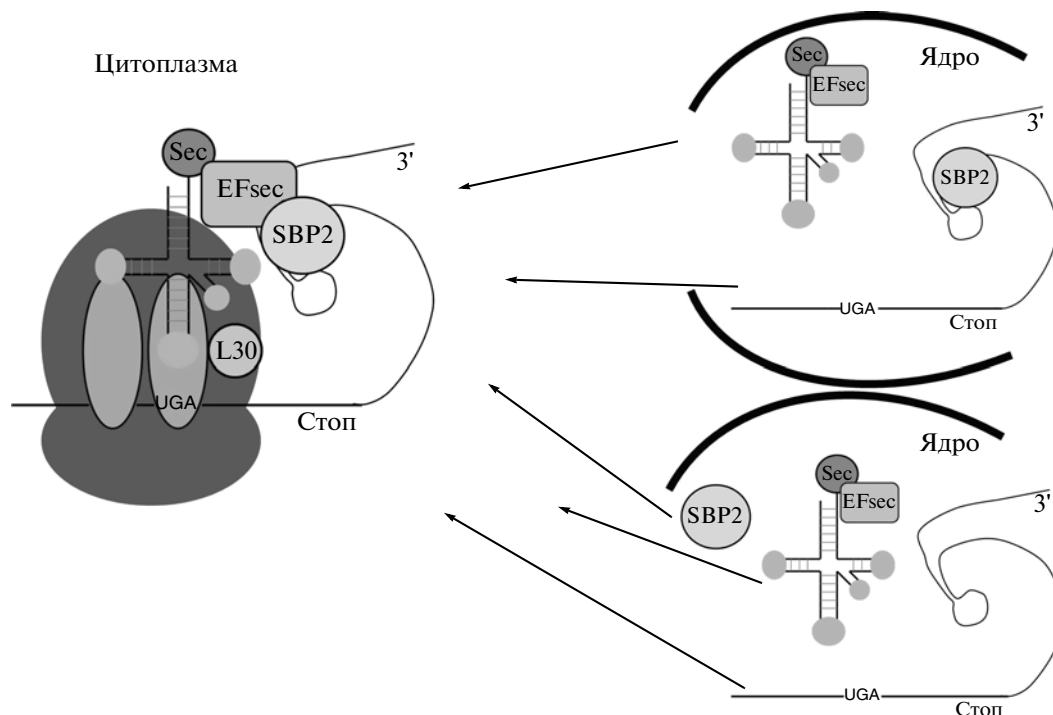


Рис. 3. Схематическое изображение двух моделей, описывающих процесс встраивания селеноцистеина в синтезируемые белки.

показано ранее, eIF4a1 с высоким сродством связывается с РНК-аптамером, в структуре которого выделяют две петли, необходимых для связывания с eIF4a1 [81]. Аптамер может связываться с двумя доменами eIF4a1, что, в свою очередь, приводит к изменению конформации мРНК. Внутренняя и внешняя петли SECIS-элементов играют важную роль во взаимодействии eIF4a3-SECIS, что позволило по аналогии с моделью комплекса eIF4a1-аптамер РНК предложить модель формирования данного комплекса. Согласно этой модели, SECIS-элемент типа I представляет собой РНК-аптамер, который фиксирует белок с DEAD-боксом. Один домен eIF4a3 может взаимодействовать с внутренней петлей SECIS, тогда как другой – с внешней. Подобное связывание eIF4a3 с двумя отдаленными участками SECIS-элемента приводит к конформационным изменениям в мРНК, и она теряет способность связываться с белком SBP2 [78].

### БИОСИНТЕЗ СЕЛЕНОЦИСТЕИНА В УСЛОВИЯХ *in vitro* И *in vivo*

Исследования *in vitro* показали, что химически синтезированный селенофосфат служит активным донором селена при биосинтезе Sec [10–12]. При нокадауне путем РНК-интерференции генов,

кодирующих белки SPS1 и SPS2, биосинтез Sec прекращался при низком уровне только белка SPS2, но не SPS1 [12]. Клетки NIH 3T3 мыши трансфицировали siРНК (siSPS1 и siSPS2 соответственно) и через 48 ч инкубировали их с <sup>75</sup>Se, после чего определяли уровень синтеза селен-содержащих белков. Биосинтез Sec и его встраивание в селен-содержащие белки наблюдали при нокадауне только SPS1, но не SPS2. Кроме того, стабильно трансфицированные вектором siSPS2 клетки NIH 3T3 трансфицировали по отдельности векторами, кодирующими SPS1 и SPS2 мыши, а также SPS2 мыши, в котором Sec заменен на Cys, и SelD. Оказалось, что синтез селен-содержащих белков восстанавливался во всех случаях, за исключением клеток, трансфицированных SPS1. Полученные результаты подтверждают, что белок SPS2, вовлеченный в синтез селенофосфата *in vivo*, крайне необходим для биосинтеза селен-содержащих белков, а SPS1, вероятнее всего, выполняет в клетке какие-то функции, не связанные со встраиванием Sec [12].

Таким образом, к настоящему времени существуют две феноменологические модели, описывающие механизм распознавания UGA-кодона как Sec-кодона в процессе биосинтеза селен-содержащих белков. Согласно первой модели, SBP2 связывается с рибосомой после обнаружения

UGA, SECIS-элемент взаимодействует с доменом SBP2 L7Ae, который далее стабилизируется с участием SID. Это, в свою очередь, способствует восстановлению EFSec с помощью SBP2 [49]. Во второй модели SBP2 не перемещается с рибосомой, напротив, он связывается с SECIS-элементом и служит платформой для восстановления комплекса EFSec/Sec-тРНК<sup>[Ser]<sup>Sec</sup> до момента распознавания UGA-кодона [55]. Сближение рибосомы приведет к тому, что L30 отдалится от SBP2 и свяжется с SECIS-элементом, что, в конечном счете, вызовет высвобождение Sec-тРНК<sup>[Ser]<sup>Sec</sup> и гидролиз GTP. Схематически эти модели приведены на рис. 3.</sup></sup>

Несмотря на то, что в последние десятилетия происходит накопление знаний о процессах, сопутствующих встраиванию Sec в синтезируемые белки, детальное понимание механизмов этих процессов до сих пор отсутствует. Безусловно, ясно одно, что Sec — это уникальная аминокислота, исключительно интересная как с биохимической, так и с молекулярной точки зрения. Вовлеченность большого числа *цис*- и *транс*-активных факторов в процессы, связанные как с биосинтезом Sec, так и с его встраиванием в селен-содержащие белки, дает основание говорить о значимости Sec для нормального функционирования организма.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, программы Министерства образования и науки РФ “Поддержка ведущих научных школ” (НШ-1853.2012.4) и гранта РФФИ № 13-04-00576.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Birringer M., Pilawa S., Flohe L. 2002. Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 693–718.
- Driscoll D.M., Copeland P.R. 2003. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* **23**, 17–40.
- Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3565–3576.
- Zhang Y., Gladyshev V.N. 2010. General trends in trace element utilization revealed by comparative genomic analyses of Co, Cu, Mo, Ni, and Se. *J. Biol. Chem.* **285**, 3393–3405.
- Zhang Y., Gladyshev V.N. 2009. Comparative genomics of trace elements: emerging dynamic view of trace element utilization and function. *Chem. Rev.* **109**, 4828–4861.
- Berry M.J., Banu L., Larsen P.R. 1991. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature.* **349**, 438–440.
- Copeland P.R., Fletcher J.E., Carlson B.A., Hatfield D.L., Driscoll D.M. 2000. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* **19**, 306–314.
- Martin G.W. III, Harney J.W., Berry M.J. 1996. Selenocysteine incorporation in eukaryotes: insights into mechanism and efficiency from sequence, structure, and spacing proximity studies of the type 1 deiodinase SECIS element. *RNA.* **2**, 171–182.
- Forchhammer K., Leinfelder W., Boesmiller K., Veprek B., Bock A. 1991. Selenocysteinesynthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (*selA*) and purification of the protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 6318–6323.
- Forchhammer K., Boesmiller K., Bock A. 1991. The function of selenocysteinesynthase and SELB in the synthesis and incorporation of selenocysteine. *Biochimie.* **73**, 1481–1486.
- Forchhammer K., Bock A. 1991. Selenocysteinesynthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. *J. Biol. Chem.* **266**, 6324–6328.
- Xu X.M., Carlson B.A., Mix H., Zhang Y., Saira K., Glass R.S., Berry M.J., Gladyshev V.N., Hatfield D.L. 2007. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol.* **5**, 122–128.
- Glass R.S., Singh W.P., Jung W., Veres Z., Scholz T.D., Stadtman T.C. 1993. Mono-selenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. *Biochemistry.* **32**, 12555–12559.
- Guimarães M.J., Peterson D., Vicari A., Cocks B.G., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Ferrick D.A., Kastelein R.A., et al. 1996. Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 15086–15091.
- Kim I.Y., Stadtman T.C. 1995. Selenophosphatesynthetase: detection in extracts of rat tissues by immunoblot assay and partial purification of the enzyme from the archaean *Methanococcus vannielii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 7710–7713.
- Kim I.Y., Guimaraes M.J., Zlotnik A., Bazan J.F., Stadtman T.C. 1997. Fetal mouse selenophosphatesynthetase 2 (SPS2): characterization of the cysteine mutant form over produced in a baculovirus-insect cell system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 418–421.
- Low S.C., Harney J.W., Berry M.J. 1995. Cloning and functional characterization of human selenophosphatesynthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 21659–21664.
- Böck A., Forchhammer K., Heider J., Baron C. 1991. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 463–467.
- Hubert N., Sturchler C., Westhof E., Carbon P., Krol A. 1998. The 9/4 secondary structure of eukaryotic selenocysteine tRNA: more pieces of evidence. *RNA.* **4**, 1029–1033.

20. Baron C., Westhof E., Böck A., Giege R. 1993. Solution structure of selenocysteine inserting tRNA<sup>(Sec)</sup> from *Escherichia coli*. Comparison with canonical tRNA<sup>(Ser)</sup>. *J. Mol. Biol.* **231**, 274–292.
21. Amberg R., Urban C., Reuner B., Scharff P., Pomerantz S.C., McClockey J.A., Gross. H.J. 1993. Editing does not exist for mammalian selenocysteine tRNAs. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5583–5585.
22. Diamond A.M., Dudock B., Hatfield D.L. 1981. Structure and properties of a bovine liver UGA suppressor serine tRNA with a tryptophan anticodon. *Cell.* **25**, 497–506.
23. Diamond A.M., Choi I.S., Crain P.F., Hashizume T., Pomerantz S.C., Cruz R., Steer C., Hill K.E., Burk R.F., McCloskey J.A., Hatfield D.L. 1993. Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>. *J. Biol. Chem.* **268**, 14215–14223.
24. Lee B.J., P. de la Pena, Tobian J.A., Zasloff M., Hatfield D.L. 1987. Unique pathway of expression of an opal suppressor phosphoserine tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 6384–6388.
25. Xu X.M., Zhou X., Carlson B.A., Kim L.K., Huh T.L., Lee B.J., Hateld D.L. 1999. The zebrafish genome contains two distinct selenocysteine tRNA<sup>[Ser]<sup>sec</sup></sup> genes. *FEBS Lett.* **454**, 16–20.
26. Klein D.J., Schmeing T.M., Moore P.B., Steitz T.A. 2001. The kink-turn: A new RNA secondary structure motif. *EMBO J.* **20**, 4214–4221.
27. Henras A.K., Dez C., Henry Y. 2004. RNA structure and function in C = D and H = ACAs (no) RNPs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 335–343.
28. Mactas S., Bragulat M., Tardiff D.F., Vilardell J. 2008. L30 binds the nascent RPL30 transcript to repress U2 snRNP recruitment. *Mol. Cell.* **30**, 732–742.
29. Tiedge H. 2006. K-turn motifs in spatial RNA coding. *RNA Biol.* **3**, 133–139.
30. Donovan J., Copeland P.R. 2010. Threading the needle: getting selenocysteine into proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 881–892.
31. Chapple C.E., Guigó R., Krol A. 2009. SECISaln, a web-based tool for the creation of structure-based alignments of eukaryotic SECIS elements. *Bioinformatics.* **25**, 674–675.
32. Korotkov K.V., Novoselov S.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2002. Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (Sec) incorporation is supported by a new form of Sec insertion sequence element. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1402–1411.
33. Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehntab O., Guigó R., Gladyshev V.N. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* **300**, 1439–1443.
34. Novoselov S.V., Lobanov A.V., Hua D., Kasaikina M.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2007. A highly efficient form of the selenocysteine insertion sequence element in protozoan parasites and its use in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 7857–7862.
35. Novoselov S.V., Rao M., Onoshko N.V., Zhi H., Kryukov G.V., Xiang Y., Weeks D.P., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* **21**, 3681–3693.
36. Hatfield D.L. 2001. *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Norwell, Mass.: Kluwer Acad. Publ.
37. Rother M., Resch A., Gardner W.L., Whitman W.B., Bock A. 2001. Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3-non-translated region. *J. Mol. Microbiol.* **40**, 900–908.
38. Mix H., Lobanov A.V., Gladyshev V.N. 2007. SECIS elements in the coding regions of Selenoprotein transcripts are functional in higher eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **35**, 414–423.
39. Shisler J.L., Senkevich T.G., Berry M.J., Moss B. 1998. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. *Science.* **279**, 102–105.
40. Kryukov G.V., Kryukov V.M., Gladyshev V.N. 1999. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J. Biol. Chem.* **274**, 33888–33897.
41. Castellano S., Morozova N., Morey M., Berry M.J., Serras F., Corominas M., Guigó R. 2001. *In silico* identification of novel selenoproteins in the *Drosophila melanogaster* genome. *EMBO J.* **2**, 697–702.
42. Castellano S., Gladyshev V.N., Guigó R., Berry M.J. 2008. SelenoDB 1.0: a database of selenoprotein genes, proteins and SECIS elements. *Nucl. Acids Res.* **36**, 332–338.
43. Berry M.J., Tujebajeva R.M., Copeland P.R., Xu X.M., Carlson B.A., Martin G.W.III, Low S.C., Mansell J.B., Grundner-Culemann E., Harney J.W., et al. 2001. Selenocysteine incorporation directed from the 30UTR: characterization of eukaryotic EFsec and mechanistic implications. *J. Biofactors.* **14**, 17–24.
44. Copeland P.R., Driscoll D.M. 1999. Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 25447–25454.
45. Copeland P.R., Stepanik V.A., Driscoll D.M. 2001. Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2. *J. Mol. Cell Biol.* **21**, 1491–1498.
46. Fletcher J.E., Copeland P.R., Driscoll D.M., Krol A. 2001. The selenocysteine incorporation machinery: interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2. *RNA.* **7**, 1442–1453.
47. Fagegaltier D., Hubert N., Yamada K., Mizutani T., Carbon P., Krol A. 2000. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. *EMBO J.* **19**, 4796–4805.
48. Tujebajeva R.M., Copeland P.R., Xu X.M., Carlson B.A., Harney J.W., Driscoll D.M. Hatfield D.L., Berry M.J.



2000. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO J.* **1**, 158–163.
49. Donovan J., Caban K., Ranaweera R., Gonzales-Flores J.N., Copeland P.R. 2008. A novel protein domain induces high affinity selenocysteine insertion sequence binding and elongation factor recruitment. *J. Biol. Chem.* **283**, 35129–35139.
  50. Donovan J., Copeland P.R. 2009. Evolutionary history of selenocysteine incorporation from the perspective of SECIS binding proteins. *BMC Evol. Biol.* **9**, 229.
  51. Andersen G.R., Pedersen L., Valente L., Chatterjee I., Kinzy T.G., Kjeldgaard M., Nyborg J. 2000. Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the yeast elongation factor complex eEF1A: eEF1B $\alpha$ . *Mol. Cell.* **6**, 1261–1266.
  52. Noble C.G., Song H. 2008. Structural studies of elongation and release factors. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 1335–1346.
  53. Zavacki A.M., Mansell J.B., Chung M., Klimovitsky B., Harney J.W., Berry M.J. 2003. Coupled tRNA(Sec)-dependent assembly of the selenocysteine decoding apparatus. *Mol. Cell.* **11**, 773–781.
  54. Copeland P.R. 2003. Regulation of gene expression by stop codon recoding: selenocysteine. *Gene.* **312**, 17–25.
  55. Chavatte L., Brown B.A., Driscoll D.M. 2005. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1**, 25.
  56. Halic M., Becker T., Frank J., Spahn C.M., Beckmann R. 2005. Localization and dynamic behavior of ribosomal protein L30e. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 467–468.
  57. Squires J.E., Stoytchev I., Forry E.P., Berry M.J. 2007. SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7848–7855.
  58. Wu R., Shen Q., Newburger P.E. 2000. Recognition and binding of the human selenocysteine insertion sequence by nucleolin. *J. Cell Biochem.* **77**, 507–516.
  59. Li Q., Imataka H., Morino S., Rogers G.W. Jr., Richter-Cook N.J., Merrick W.C., Sonenberg N. 1999. Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7336–7346.
  60. Chan C.C., Dostie J., Diem M.D., Feng W., Mann M., Rappsilber J., Dreyfuss G. 2004. eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA.* **10**, 200–209.
  61. Shibuya T., Tange T.O., Sonenberg N., Moore M.J. 2004. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 346–351.
  62. Palacios I.M., Gatfield D., St Johnston D., Izaurralde E. 2004. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA. *Nature.* **427**, 753–757.
  63. Ferraiuolo M.A., Lee C.S., Ler L.W., Hsu J.L., Costamattioli M., Luo M.J., Reed R., Sonenberg N. 2004. A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 4118–4123.
  64. Budiman M.E., Bubenik J.L., Miniard A.C., Middleton L.M., Gerber C.A., Cash A., Driscoll D.M. 2009. Eukaryotic initiation factor 4a3 is a selenium-regulated RNA-binding protein that selectively inhibits selenocysteine incorporation. *Mol. Cell.* **35**, 479–489.
  65. Bermano G., Nicol F., Dyer J.A., Sunde R.A., Beckett G.J., Arthur J.R., Hesketh J.E. 1996. Selenoprotein gene expression during selenium-repletion of selenium-deficient rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **51**, 211–223.
  66. Moskovitz J., Stadtman E.R. 2003. Selenium-deficient diet enhances protein oxidation and affects methionine sulfoxide reductase (MsrB) protein level in certain mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 7486–7490.
  67. Novoselov S.V., Kim H.Y., Hua D., Lee B.C., Astle C.M., Harrison D.E., Friguet B., Moustafa M.E., Carlson B.A., Hatfield D.L., et al. 2010. Regulation of selenoproteins and methionine sulfoxide reductases A and B1 by age, calorie restriction, and dietary selenium in mice. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 829–838.
  68. Weiss Sachdev S., Sunde R.A. 2001. Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver. *Biochem. J.* **357**, 851–858.
  69. Cheng W.H., Ho Y.S., Ross D.A., Valentine B.A., Combs G.F., Lei X.G. 1997. Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *J. Nutr.* **127**, 1445–1450.
  70. Fomenko D.E., Novoselov S.V., Natarajan S.K., Lee B.C., Koc A., Carlson B.A., Lee T.H., Kim H.Y., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2009. MsrB1 (methionine-R-sulfoxide reductase 1) knock-out mice: roles of MsrB1 in redox regulation and identification of a novel selenoprotein form. *J. Biol. Chem.* **284**, 5986–5993.
  71. Ho Y.S., Magnenat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C.D. 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 16644–16651.
  72. Jakupoglu C., Przemeczek G.K., Schneider M., Moreno S.G., Mayr N., Hatzopoulos A.K., de Angelis M.H., Wurst W., Bornkamm G.W., Brielmeier M., et al. 2005. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1980–1988.
  73. Yant L.J., Ran Q., Rao L., Van Remmen H., Shibatani T., Belter J.G., Motta L., Richardson A., Prolla T.A. 2003. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 496–502.
  74. Schneider M.J., Fiering S.N., Thai B., Wu S.Y., St Germain E., Parlow A.F., St Germain D.L., Galton V.A. 2006. Targeted disruption of the type 1 seleno-

- deiodinase gene (*Dio1*) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology*. **147**, 580–589.
75. Allamand V., Richard P., Lescure A., Ledeuil C., Desjardin D., Petit N., Gartioux C., Ferreiro A., Krol A., Pellegrini N., et al. 2006. A single homozygous point mutation in a 3' untranslated region motif of selenoprotein N mRNA causes SEPNI-related myopathy. *EMBO Rep.* **7**, 450–454.
76. Moghadaszadeh B., Petit N., Jaillard C., Brockington M., Roy S.Q., Merlini L., Romero N., Estournet B., Desguerre I., Chaigne D., et al. 2001. Mutations in SEPNI cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat. Genet.* **29**, 17–18.
77. Dikiy A., Novoselov S.V., Fomenko D.E., Sengupta A., Carlson B.A., Cerny R.L., Ginalski K., Grishin N.V., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. 2007. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. *Biochemistry*. **46**, 6871–6882.
78. Budiman M.E., Bubenik J.L., Driscoll D.M. 2011. Identification of a signature motif for the eIF4a3-SECIS interaction. *Nucl. Acids Res.* **39**, 7730–7739.
79. Bono F., Ebert J., Lorentzen E., Conti E. 2006. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell*. **126**, 713–725.
80. Andersen C.B., Ballut L., Johansen J.S., Chamieh H., Nielsen K.H., Oliveira C.L., Pedersen J.S., Seraphin B., Le Hir H., Andersen G.R. 2006. Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science*. **313**, 1968–1972.
81. Oguro A., Ohtsu T., Svitkin Y.V., Sonenberg N., Nakamura Y. 2003. RNA aptamers to initiation factor 4A helicase hinder cap-dependent translation by blocking ATP hydrolysis. *RNA*. **9**, 394–407.