

УДК 577.217.34

РИБОСОМА: УРОКИ СТРОИТЕЛЬСТВА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФАБРИКИ

© 2014 г. О. В. Сергеева^{1,3*}, П. В. Сергиев^{1,2}, А. А. Богданов^{1,2}, О. А. Донцова^{1,2}

¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Московская область, 143025

Поступила в редакцию и принята к печати 29.01.2014 г.

Рибосома – макромолекулярный комплекс, осуществляющий синтез белков. В состав двух субчастиц бактериальной рибосомы входят три молекулы РНК суммарной длиной более 4000 н. и более 50 белков. Сборка рибосомы представляет собой сложный многоступенчатый процесс, жизненно важный для всех клеток. В обзоре рассмотрены существующие представления о механизме сборки бактериальной рибосомы в живой клетке и во внеклеточных модельных системах. До сих пор некоторые детали сборки этой клеточной машины остаются неизвестными.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, рибосома, трансляция, РНК-хеликаза, ГТРаза, РНК-метилтрансфераза, рибонуклеопротеидный комплекс.

RIBOSOME: LESSONS OF A MOLECULAR FACTORY CONSTRUCTION, by O. V. Sergeeva^{1,3*}, P. V. Sergiev^{1,2}, A. A. Bogdanov^{1,2}, O. A. Dontsova^{1,2} (¹Chemistry Department, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: olga.sergeeva.v@gmail.com; ²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; ³Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow region, 143025 Russia). Ribosome is a macromolecular complex, which is responsible for protein biosynthesis. Two bacterial ribosomal subunits contain more than 4000 RNA nucleotides and 50 proteins. Ribosome assembly is a complicated multi-step process, vitally important for cell. In this review we summarised present-day conceptions about the mechanism of the bacterial ribosome assembly in the cell and *in vitro* model systems. Some details of the assembly of this machinery are still unknown.

Keywords: *E. coli*, ribosome, translation, RNA helicases, GTPase, RNA methyltransferase, ribonucleoprotein.

DOI: 10.7868/S0026898414040119

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – самая распространенная молекулярная машина клетки, основной функцией которой является синтез белков. Основная масса клеточной РНК представлена именно рРНК. Рибосома состоит из малой (рис. 1а) и большой (рис. 1б) субчастиц, на которые она обратимо диссоциирует. У кишечной палочки (*Escherichia coli*) эти субчастицы называются 50S и 30S в соответствии со своими коэффициентами седиментации [1]. Размер прокариотической рибосомы равен примерно 20 × 17 × 17 нм, длина малой субчастицы – около 23 нм, ширина – 12 нм.

Основной компонент малой субчастицы рибосомы – 16S рРНК, состоящая из 1542 н. (рис. 2а). Помимо 16S рРНК в состав малой субчастицы входит 21 белок (от S1 до S21, в порядке увеличения электрофоретической подвижности) [2]. В

состав большой субчастицы входят две рРНК – 23S (2904 н.) и 5S (120 н.) (рис. 2б), а также 33 белка (L1–L36). Большинство рибосомных белков жизненно необходимы для клетки [3].

Различные домены вторичной структуры 16S рРНК соответствуют крупным пространственным блокам 30S субчастицы: 5'-концевой домен образует “тело” и “плечо”, центральный домен – “платформу”, содержащую последовательность анти-Шайн-Дальгарно, главный 3'-концевой домен – “голову”, а малый 3'-концевой домен 16S рРНК располагается на границе с 50S субчастицей и входит в состав “тела” 30S субчастицы. В 30S субчастице также можно отметить туннель, в котором в ходе трансляции находится 3'-концевая часть мРНК, “шпору” и “шею”, образованные спиралями 6 и 28 16S рРНК соответственно.

* Эл. почта: olga.sergeeva.v@gmail.com

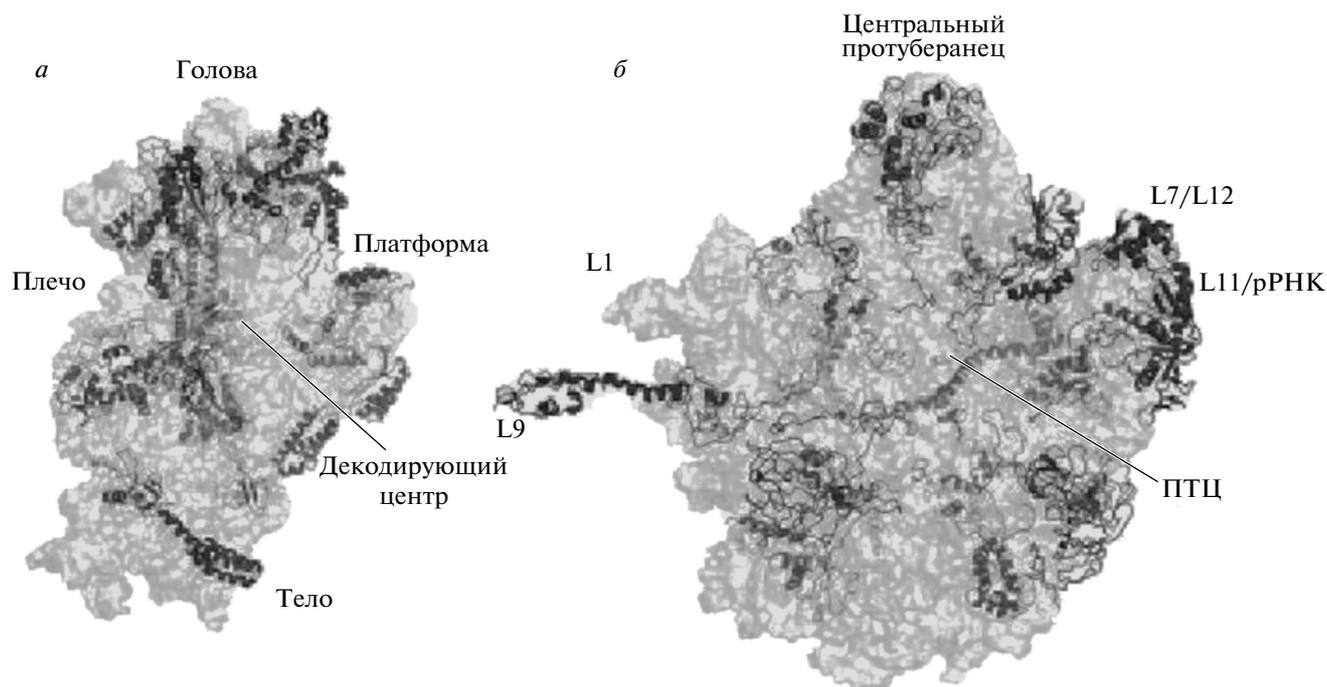


Рис. 1. Основные морфологические элементы малой 30S (согласно [2] с модификациями) (а) и большой 50S (б) субчастиц рибосомы *E. coli*. Вид на малую субчастицу со стороны большой, и на большую со стороны малой. ПТЦ — пептидилтрансферный центр.

Основная функция 30S субчастицы — считывание мРНК [4, 5].

В пространственной структуре большой субчастицы можно выделить характерные выступы: “пальцы” L1 и L7/L12, а также центральный протуберанец, образованный 5S рРНК и белками L5, L18 и L25. Кроме того, в структуре 50S субчастицы видна ложбина, в глубине которой находится каталитический пептидилтрансферный центр рибосомы. От пептидилтрансферного центра к цитоплазматической стороне 50S субчастицы идет сквозной туннель, служащий для выхода синтезируемого пептида. Туннель длиной около 100 Å и диаметром примерно 25 Å может вмещать пептид из 40 аминокислотных остатков. Обе субчастицы образуют тРНК-связывающие участки А, Р и Е, через которые при синтезе полипептида последовательно проходят тРНК [6]. Сборка рибосомы представляет собой сложный и точно скоординированный процесс, основными этапами которого являются: а) транскрипция, процессинг и модификация рРНК; б) синтез и модификация рибосомных белков; в) сворачивание (фолдинг) рРНК и рибосомных белков; г) связывание рибосомных белков с рРНК; д) связывание дополнительных белков, участвующих в сборке. Многие из этих этапов осуществляются одновременно [7].

НУКЛЕОЛИТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕССИНГ рРНК

Все три рРНК (16S, 23S, 5S) синтезируются в виде одного транскрипта (рис. 3). Созревание транскрипта, образование локальных элементов вторичной структуры и связывание первых рибосомных белков начинается еще до окончания процесса транскрипции рРНК. Одновременно с этим ферментативной модификации подвергаются определенные нуклеотиды [4].

Первой эндорибонуклеазой, которая разрезает рРНК-транскрипт, является РНКаза III. Она отделяет предшественник рРНК от тРНК. В процессе транскрипции последовательности, фланкирующие 16S и 23S рРНК, формируют двойную спираль. Именно этот элемент узнается РНКазой III [8]. В итоге образуются предшественники 16S рРНК (17S рРНК), 23S рРНК, 5S рРНК (9S) и нескольких тРНК. РНКазы E, G и какие-то еще неизвестные удаляют 115 н. с 5'-конца и 33 н. с 3'-конца рРНК-транскрипта, что приводит к образованию 16S рРНК. Созревание 23S рРНК инициируется РНКазой III. 23S рРНК, вырезанная РНКазой III, содержит лишние нуклеотиды — три или семь на 5'-конце и семь или девять — на 3'-конце [9]. Конечный процессинг 5'-конца осуществляет пока неизвестный фермент, а за созревание 3'-конца отвечает экзорибонуклеаза РНКаза T. После разрезания РНКазой III с 3'-стороны от предшественника 5S рРНК остаются одна или две

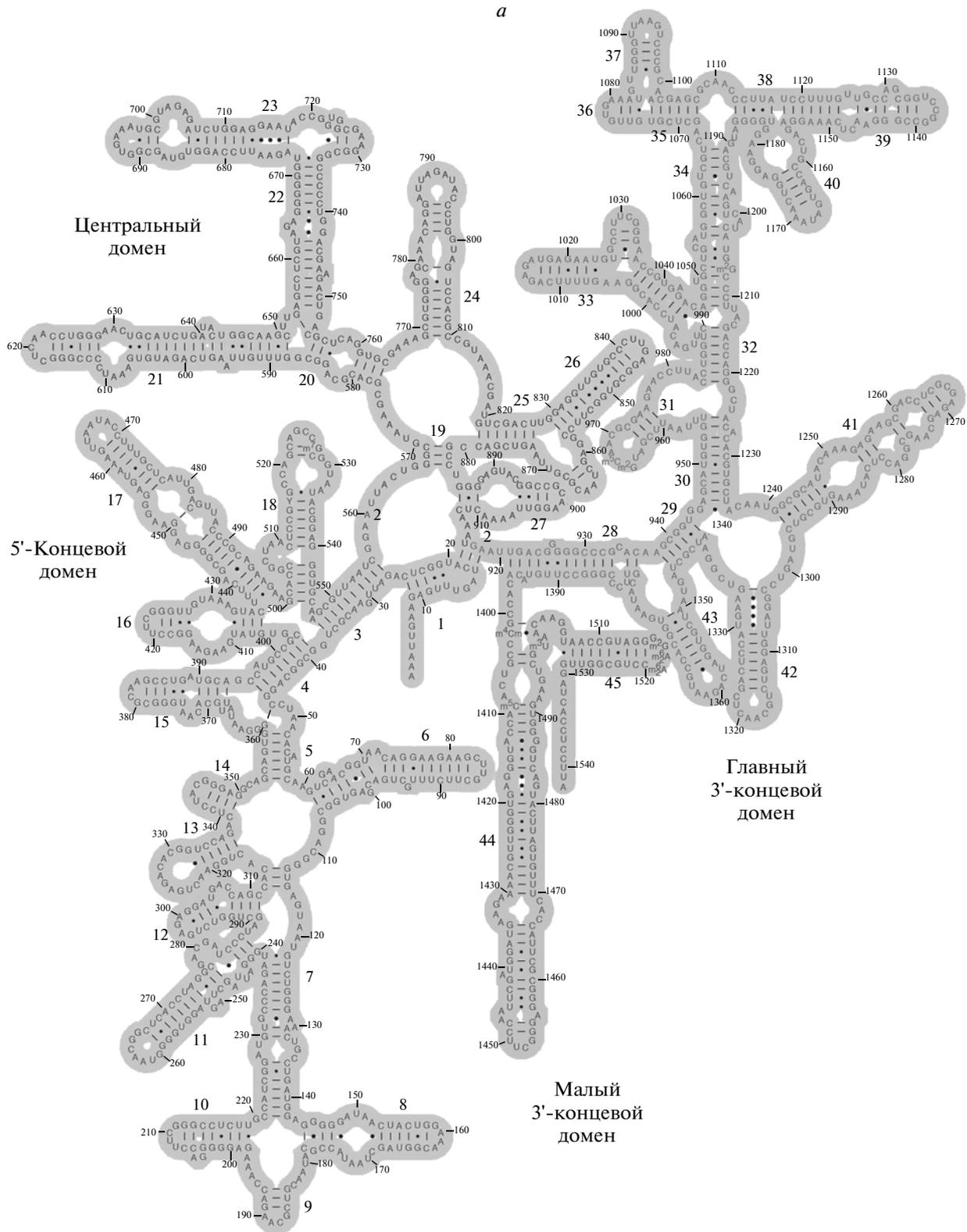


Рис. 2. Схемы вторичной структуры 16S рРНК (*a*) и 23S рРНК и 5S рРНК *E. coli* (*б*). Обозначены домены вторичной структуры (согласно [4, 5] с модификациями).

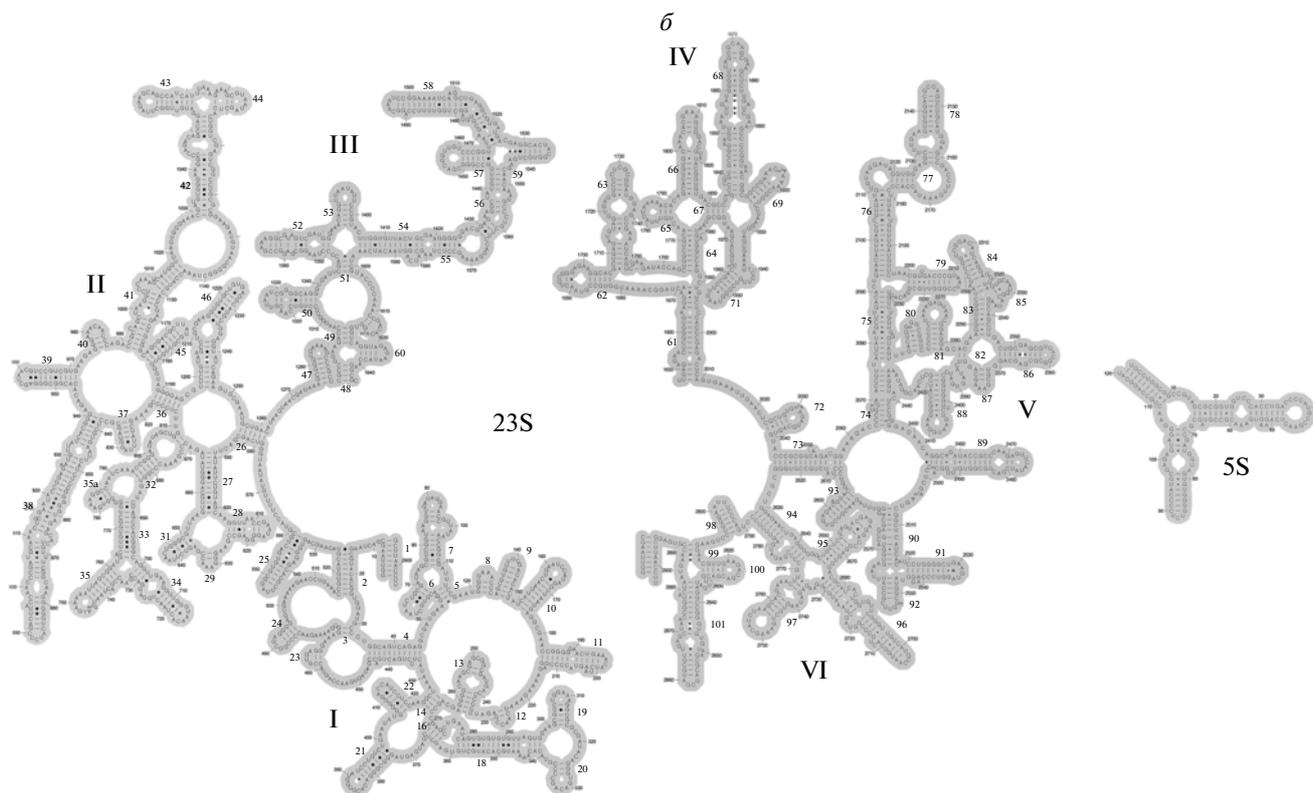


Рис. 2. Окончание.

последовательности тРНК. 5'-конец тРНК процессируется РНКазой Р, что приводит к образованию 9S рРНК с 84 дополнительными нуклеотидами на 5'-конце и 42 — на 3'-конце [10]. Завершают процессинг РНКазы Т и пока еще неизвестная РНКазы (рис. 3) [11–13].

СБОРКА 30S СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ

Белки, взаимодействующие с 16S рРНК, классифицируются по области рРНК, с которой они связываются или по очередности связывания. Белки, взаимодействующие непосредственно с рРНК, считаются первичными, за ними следуют вторичные, последними связываются третичные белки [7].

Для описания процесса формирования 30S субчастицы предложена схема, основанная на экспериментах Номуры по реконструкции 30S субчастицы *in vitro* (рис. 4а). Результаты наложения этой схемы на пространственную структуру рибосомы показаны на рис. 5а.

К белкам, связывающимся непосредственно с 16S рРНК, относятся S4, S7, S8, S15, S17 и S20. Комплекс белка S4 с 5'-частью 16S рРНК может образоваться при пониженной температуре. Далее, как показано в опытах по химической модификации рРНК (футпринтингу), при нагревании происходят конформационные изменения ком-

плекса, которые укрепляют взаимодействие белка с рРНК, а также способствуют связыванию вторичного белка S16 и третичного S12 (рис. 4). Если нагреть S4 и 16S рРНК по-отдельности, а затем смешать, то конформация не изменится, и следующие белки не свяжутся [14].

Изучение связывания остальных рибосомных белков выявило подобную же иерархию взаимодействий. Можно сделать вывод, что одна из функций первичных белков — придание РНК конформации, благоприятной для связывания следующих за ними белков. На примере белков S8 и S15 показано, что взаимное влияние одних рибосомных белков на участки присоединения других имеет место даже при независимом связывании этих белков [15]. Исследование окружения S20 показало, что его контакты с 5'-доменом рРНК образуются в начале, а взаимодействие с 3'-минорным доменом (спираль H44—нуклеотид C1399) происходит в конце сборки в соответствии с направлением сборки от 5'-к 3'-концу 16S рРНК [16].

Интермедиаты сборки 30S субчастицы *in vivo* сложно зафиксировать при нормальных условиях роста клеток. Изначально для изучения интермедиатов применяли ультрацентрифугирование цитоплазмы клеток штаммов, имеющих холодо- или термочувствительные мутации в компонентах рибосомы. В штаммах дикого типа интермедиаты

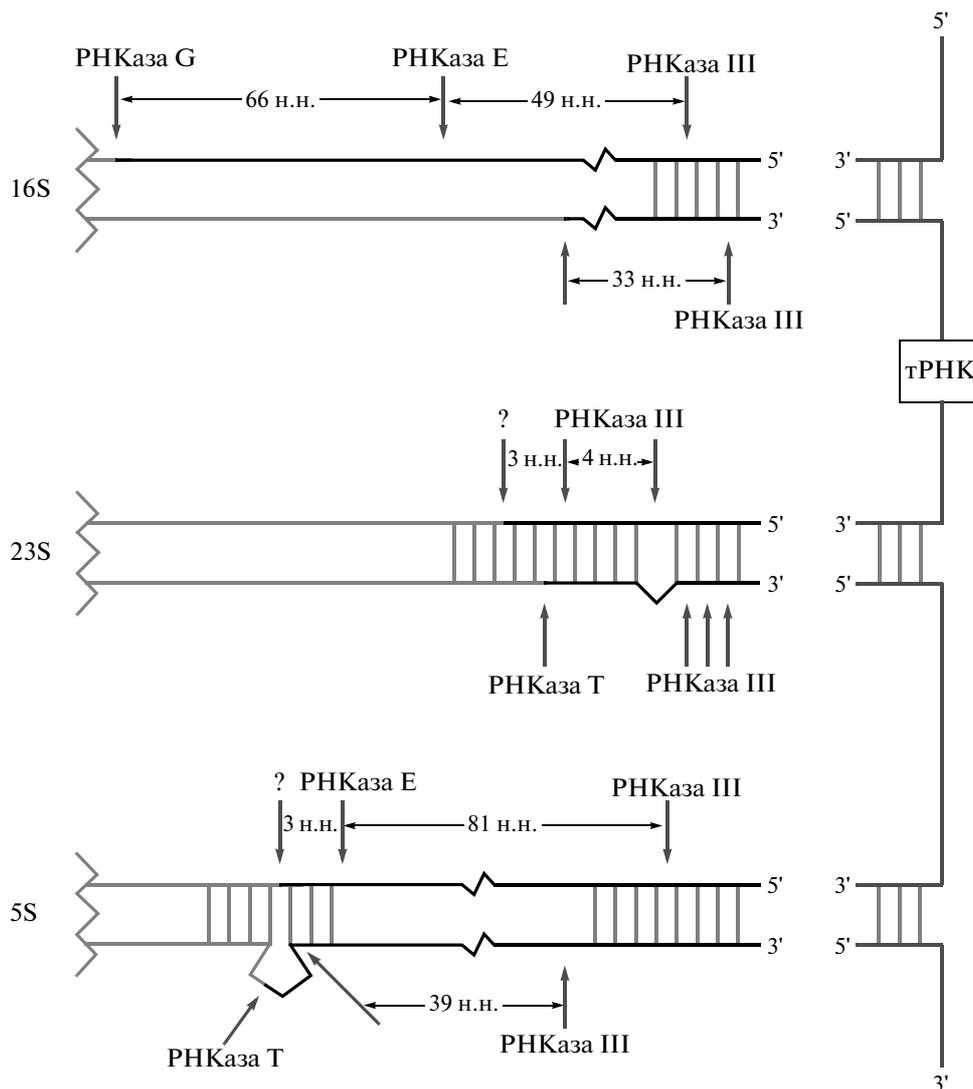


Рис. 3. Созревание рРНК. Изначально транскрибируемая в виде одного предшественника, рРНК разрезается несколькими РНКазами. Участки разрезания известными нуклеазами показаны стрелками, подписанными соответственно. Знак “?” обозначает сайт разрезания до сих пор не идентифицированного фермента (согласно [13] с модификациями).

можно зафиксировать методом импульсного мечення радиоактивными и стабильными изотопами. Таким образом *in vivo* были обнаружены два интермедиата сборки 30S субчастиц (p_130S и p_230S) (рис. 6б) [7, 17].

С помощью криоэлектронной микроскопии выявлены 14 интермедиатов сборки 30S субчастицы рибосомы *in vivo*, классифицированные как ранние, промежуточные и поздние. Ранние интермедиаты содержат 16S рРНК и белки S4, S17, S20, а также белок S16, который относится к группе вторичных белков согласно результатам Номуры *in vitro*. Термодинамические, кинетические и электронно-микроскопические данные позволили реконструировать процесс сборки 30S субчастицы *in vivo*. Сборка начинается с возникнове-

ния ранних интермедиатов, содержащих быстро связывающиеся первичные и вторичные рибосомные белки. Затем образуется вторая группа интермедиатов, включающих первичные и вторичные белки, медленно связывающиеся в области центрального и 3'-доменов. Кульминация сборки – образование четвертой группы интермедиатов в результате включения медленно связывающихся третичных белков (рис. 4б). Третью группу интермедиатов, обнаруженную с помощью электронной микроскопии, можно классифицировать как подвид четвертой группы при сборке “тела” и “головы” 30S субчастицы. Различия в данных, полученных *in vivo* и Номурой *in vitro*, можно объяснить присутствием в клетках кофакторов сбор-

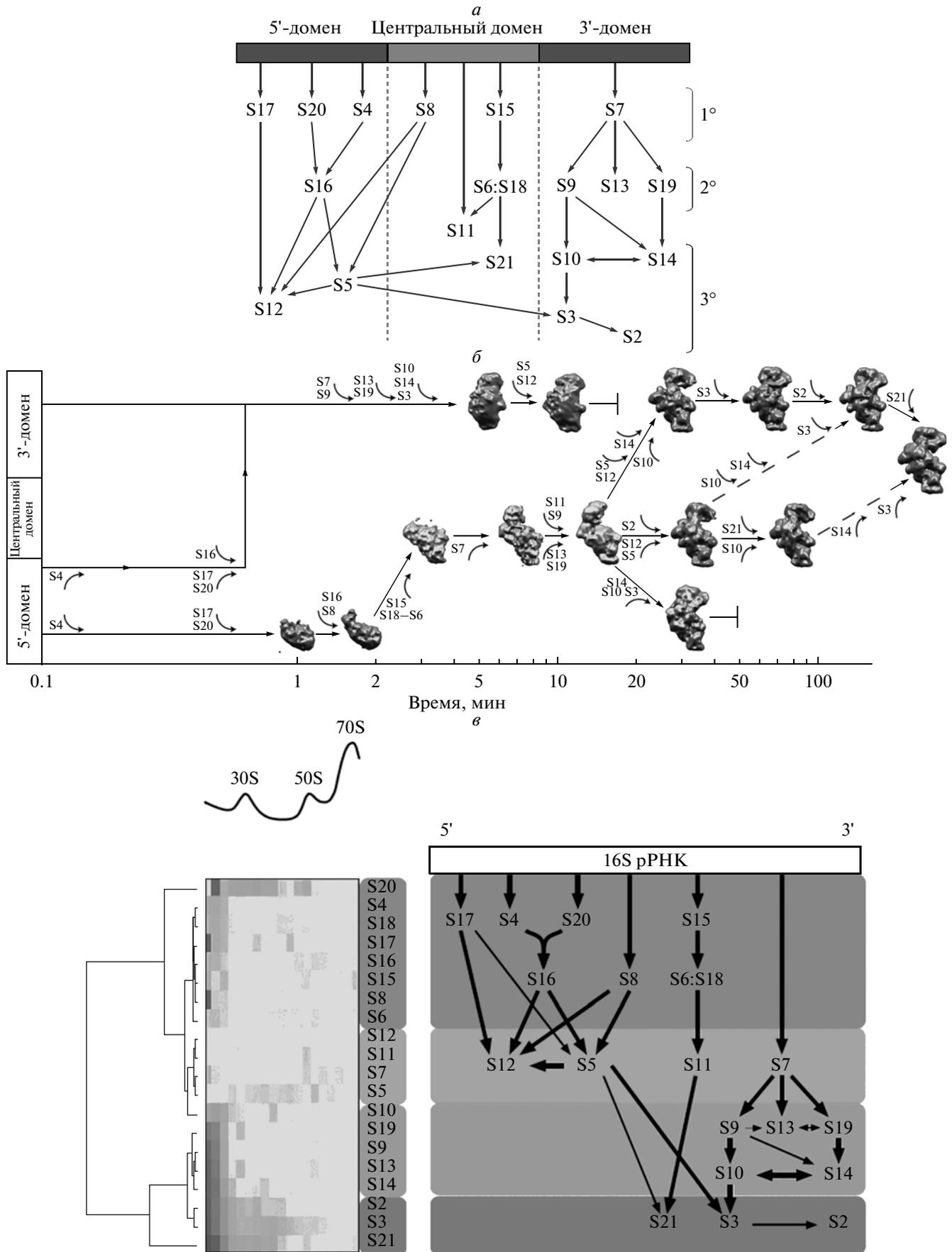


Рис. 4. Карта сборки малой субчастицы *in vitro*, предложенная Номурой (согласно [14] с модификациями) (а). Вверху схематично показана 16S рРНК, разбитая на домены. Внизу показана иерархия взаимодействия рибосомных белков с рРНК. 1 – первично связывающиеся белки, 2 – вторично связывающиеся белки, 3 – третично связывающиеся белки. Карта сборки 30S субчастицы *in vivo* на основании термодинамических, кинетических и электронно-микроскопических данных (согласно [17] с модификациями) (б). Карта сборки 30S субчастицы на основании данных хромато-масс-спектрометрии (согласно [19] с модификациями) (в).

ки рибосомы, которые сводят к минимуму образование ошибочных интермедиатов [18].

Комбинация методов радиоактивного импульсного мечения рибосом с хромато-масс-спектрометрией еще больше расширила представление об интермедиатах сборки рибосомы *in vivo* [19]. Рибосомные белки, участвующие в процессе сборки 30S

субчастицы, делятся на четыре группы в зависимости от последовательности связывания с рРНК, что полностью согласуется с данными электронной микроскопии [18]. Белки S4, S6, S8, S15, S16, S17, S18 и S20 первыми связываются с 5'- и центральными доменами 16S рРНК. Белки S7 и S11 связываются с центральным и 3'-доменами, а S5 и S12,

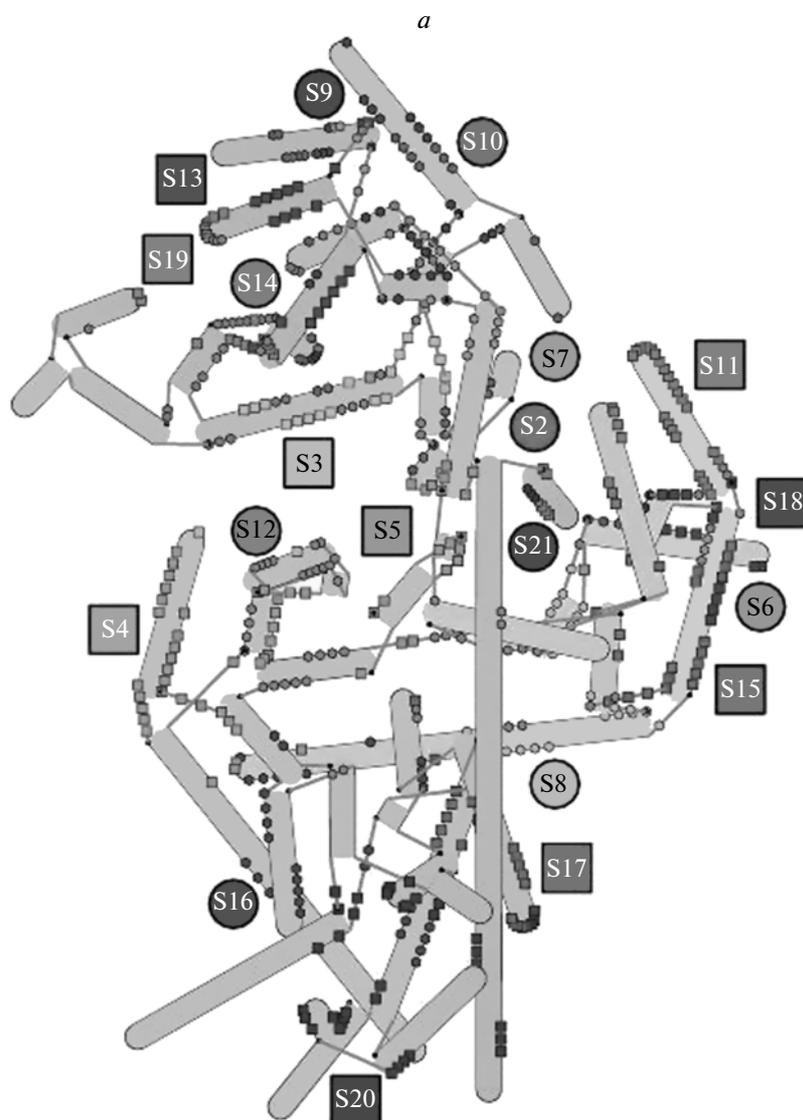


Рис. 5. Взаимодействия рибосомных белков с рРНК. а – Специфичность контактов рибосомных белков и 16S рРНК. Представлена плоская схема укладки 16S рРНК. Рибосомные белки подписаны. Оттенками серого выделены белки и нуклеотиды, находящиеся с ними в контакте. б – Скорость образования контактов 16S рРНК с рибосомными белками. Рибосомные белки и взаимодействующие с ними нуклеотиды окрашены в соответствии со скоростью связывания (согласно [17] с модификациями).

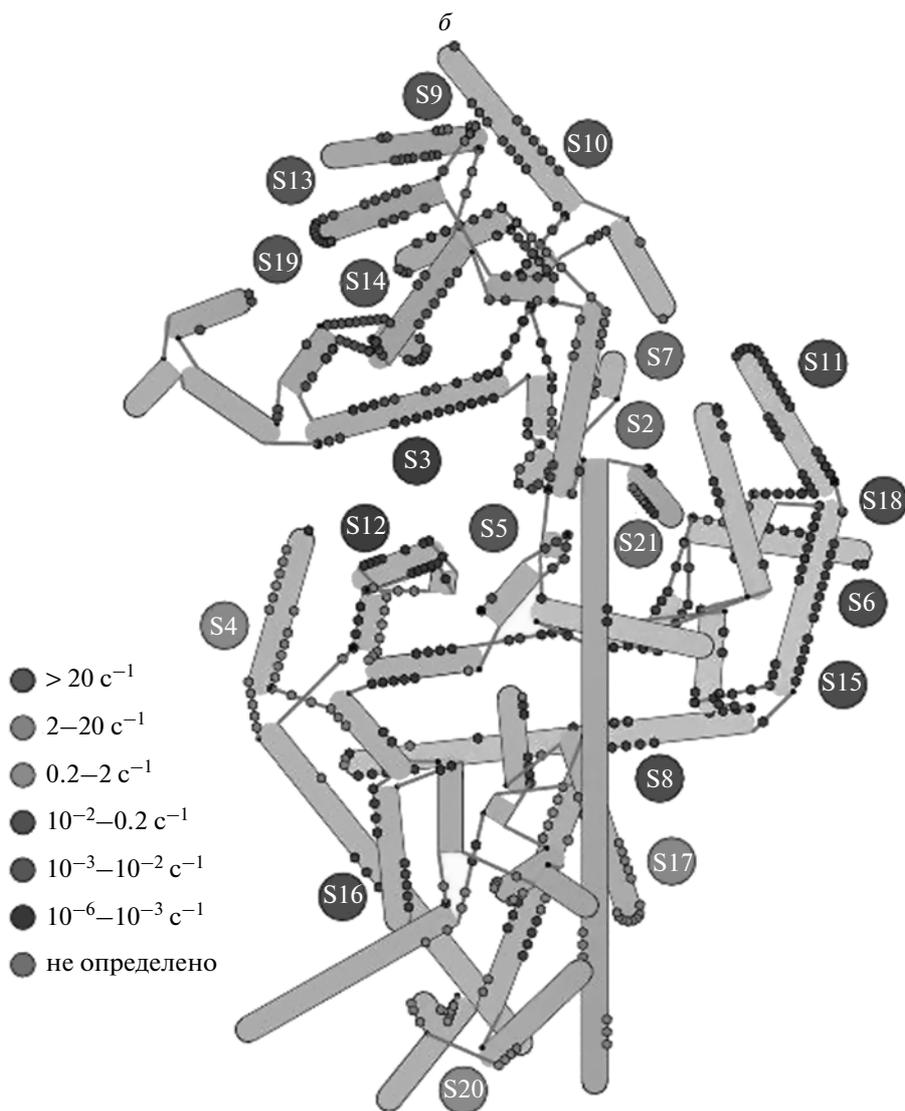


Рис. 5. Окончание.

которые относятся к вторично связывающимся белкам, с 5'-доменом. В третью группу входят белки S9, S10, S13, S14 и S19. Последнюю, четвертую, группу образуют белки S2, S3, S21. Белок S20 относится к первично связывающимся белкам *in vitro*, однако *in vivo* он взаимодействует с 30S субчастицей одним из последних (рис. 4б) [19].

При реконструкции 30S субчастицы рибосомы *in vitro* наблюдали появление двух интермедиатов, которые образуются при разной температуре. При низких температурах (от 0 до 15°C) можно зафиксировать интермедиат (RI) с коэффициентом седиментации 21S–22S, состоящий из 16S рРНК и 15 рибосомных белков. Реконструкция 30S субчастицы не может быть закончена, пока температура не повысится до 40°C. При 40°C дополнительные белки взаимодействуют с интермедиатом RI, происходят конформационные из-

менения и образуется интермедиат RI* с коэффициентом седиментации 25S–26S. К интермедиату RI* присоединяются оставшиеся белки, и формируется активная 30S субчастица (рис. 6а) [20].

Процесс сборки рибосомных субчастиц *in vitro* протекает медленнее, чем *in vivo*. Сборку *in vitro* можно ускорить, если добавить факторы, участвующие в сборке рибосом в клетке, такие как Ega, RimM, RimP [21]. Состав интермедиатов сборки *in vivo* и *in vitro*, несмотря на сходный коэффициент седиментации, может отличаться (табл. 1) [13].

Скорость связывания рибосомных белков с 16S рРНК обсуждается в работе [22]. Первичные белки обычно связываются быстрее остальных (константа скорости $0.2-2 \text{ c}^{-1}$) (рис. 5б). Белки, взаимодействующие с 5'-доменом РНК, делают это быстрее, чем белки, которые связываются с

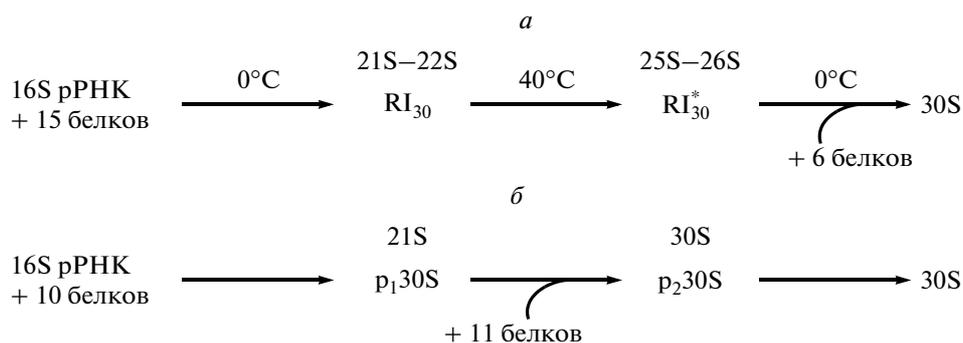


Рис. 6. Схема сборки 30S субчастицы *in vitro* (а) и *in vivo* (б) (согласно [17] и [20] с модификациями).

центральным и 3'-доменами, что подтверждает идею сборки в направлении от 5'- к 3'-концу рРНК. S5 и S12 медленнее других связываются с 5'-доменом РНК и не следуют 5' → 3'-направлению. По-видимому, это может определяться их связыванием на пересечении всех доменов рРНК возле декодирующего центра 30S субчастицы. Другой интересный пример – S7, от которого зависит последующее связывание S9, S13 и S19. Первые контакты S7 с рРНК вызывают ускорение связывания только S9, а вот комбинация S7 с S19 явно повышает скорость взаимодействия белков S9, S13, S10 с рРНК.

СБОРКА 50S СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ

У 50S субчастиц процесс сборки гораздо сложнее, чем у 30S. Это обусловлено тем, что 23S рРНК фактически в 2 раза длиннее 16S рРНК и с ней связывается в 1.5 раза больше рибосомных белков. Дополнительная сложность состоит в том, что 50S субчастица содержит не только 23S рРНК, но и 5S рРНК. В структуре 23S рРНК можно выделить шесть доменов (I–VI). Столь сложное доменное устройство рРНК позволяет предположить, что в этом случае вряд ли можно выявить какое-то определенное направление сборки в отличие от сборки 30S субчастицы – от 5'- к 3'-концу. Ниерхаусом была составлена карта реконструкции 50S субчастицы (рис. 7а) [23].

В рРНК 50S субчастицы выделяют три основных домена, по аналогии с 3'-, 5'- и центральным доменами в 16S рРНК, с которыми связываются группы белков. Домены в 23S рРНК обозначены в соответствии с коэффициентами седиментации, а именно 13S, 8S, 12S. Связывание 5S рРНК происходит на поздней стадии сборки, так как для нее необходимы белки L5, L25 и L18.

In vitro реконструкция 50S субчастиц проходит в четыре этапа. Сначала 23S рРНК, 5S рРНК и рибосомные белки инкубируют при 0°C в присутствии 4 mM Mg²⁺, при этом образуется интермедиат RI50(1), который имеет коэффициент седи-

ментации 33S. Затем смесь нагревают до 44°C, при этом конформация изменяется, и образуется новая 41S субчастица, названная RI*50(1). Добавление оставшихся белков приводит к формированию RI50(2) с коэффициентом седиментации 48S. На последнем этапе RI50(2) инкубируют при 50°C в буфере с 20 mM Mg²⁺ с образованием 50S субчастицы (рис. 8а). Коэффициенты седиментации интермедиатов, обнаруженных при сборке 50S субчастицы *in vivo* (рис. 8б), близки к значениям у интермедиатов *in vitro*.

Таблица 1. Содержание белков в *in vivo* и *in vitro* интермедиатах сборки 30S субчастицы

Белок	<i>In vitro</i> интермедиат	<i>In vivo</i> интермедиат
S1	–	+
S2	–	–
S3	–	–
S4	+	+
S5	+	+
S6	+	–
S7	+	–
S8	+	+
S9	+	–
S10	–	–
S11	+	–
S12	+	–
S13	+	+
S14	–	–
S15	+	+
S16	+	+
S17	+	+
S18	+	–
S19	+	–
S20	+	+
S21	–	+

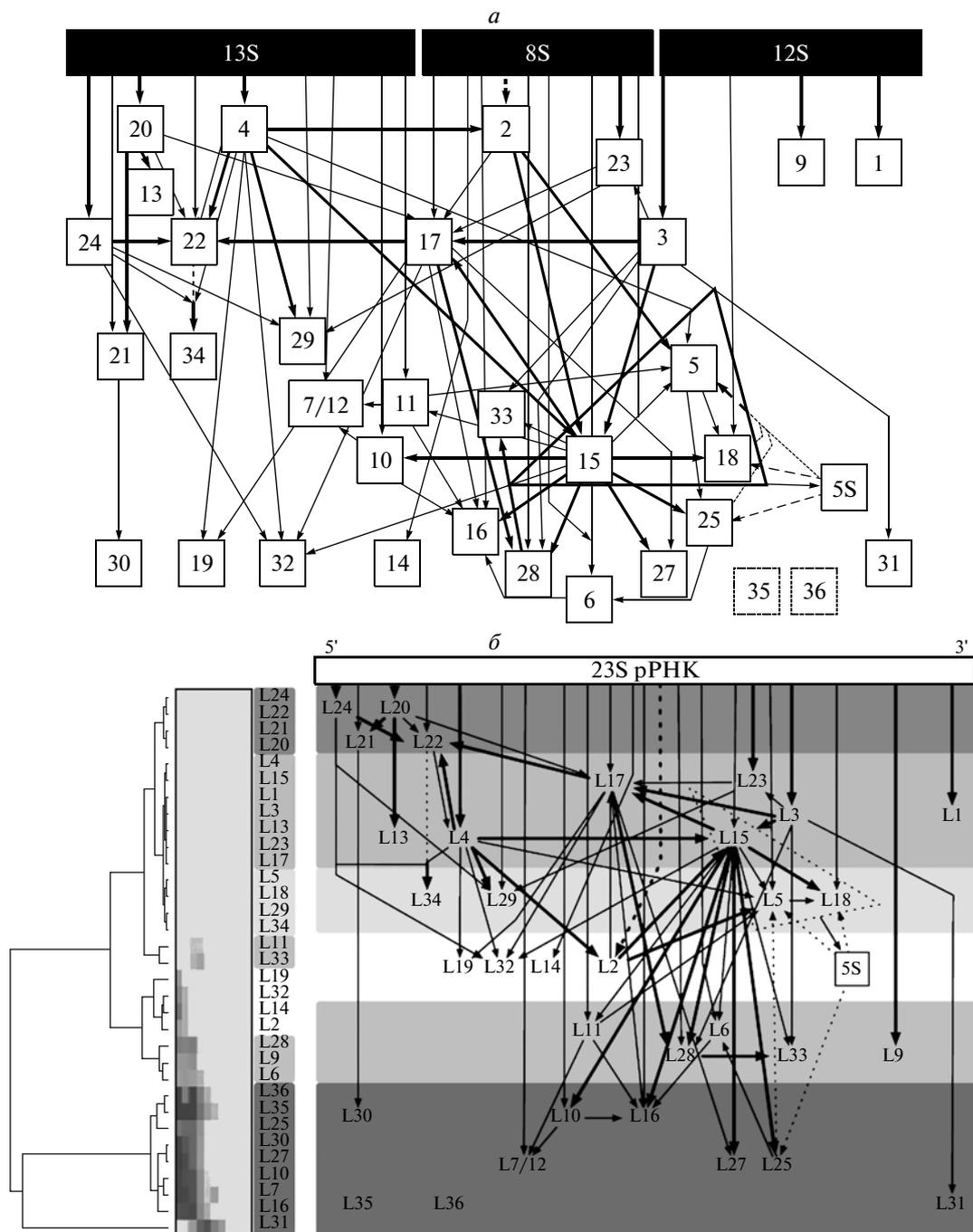


Рис. 7. *a* – Схема сборки 50S субчастицы. Вверху схематично показана 23S рРНК, разбитая на домены. Внизу показана иерархия взаимодействия рибосомных белков с рРНК. Белки показаны квадратами, цифры в которых соответствуют номеру белка. Стрелками показаны зависимости (последовательности) связывания компонентов большой субчастицы. 5S символизирует 5S рРНК. Белки, взаимодействующие с 5S рРНК, соединены с ней пунктирными стрелками. *б* – Карта сборки 50S субчастицы на основании данных хромато-масс-спектрометрии (согласно [19] с модификациями).

Пять рибосомных белков, L4, L13, L22, L24, взаимодействующих с 5'-концевой частью 23S рРНК, и рибосомный белок L3, связывающийся с 3'-концом рРНК, необходимы для образования интермедиата RI*50(1). Взаимодействие L3 с до-

меном IV рРНК и L24 с доменом I влияет на весь процесс сборки 50S субчастицы. Показано, что именно эти белки формируют два независимых центра в процессе сборки. Правильное образование центрального протуберанца зависит от бел-

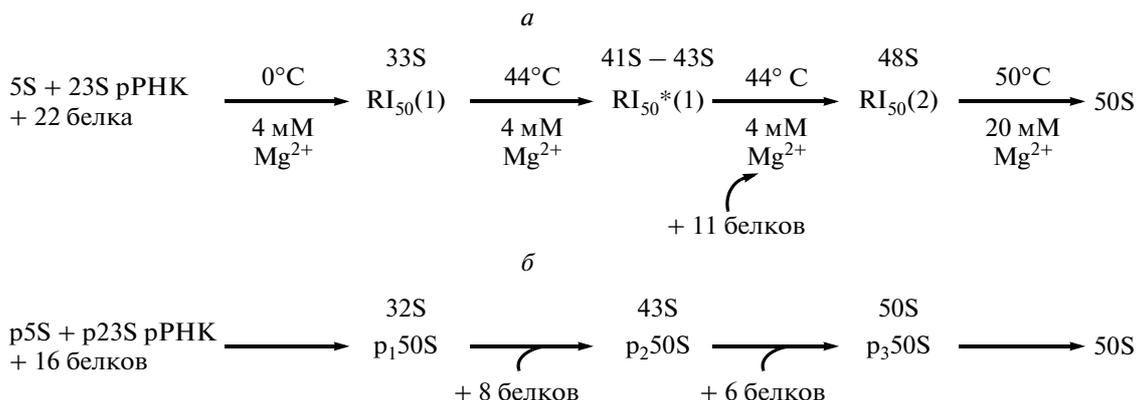


Рис. 8. Схема сборки 50S субчастицы *in vitro* (а) и *in vivo* (б) (согласно [13] с модификациями).

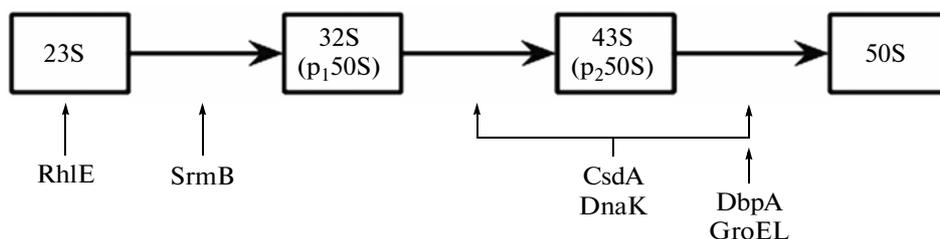


Рис. 9. Участие белковых факторов в сборке 50S субчастицы *in vivo* (согласно [19] с модификациями).

ков L5, L18 и L25. Рибосомные белки L20 и L24 считаются инициаторами сборки 50S субчастицы [13, 24].

Методом импульсного мечения *in vivo* обнаружены три интермедиата сборки 50S субчастиц, которые имеют коэффициент седиментации 32S, 43S, 50S соответственно. В логарифмической стадии роста эти предшественники составляют только 2–5% общей рНК клеток. Белковый состав интермедиатов различается: в p₂50S на восемь белков больше, чем в p₁50S. Интермедиат p₃50S имеет такой же коэффициент седиментации, как и 50S субчастица, однако пространственная укладка рНК в этом интермедиате еще отличается от укладки в зрелой субчастице. Состав интермедиатов сборки *in vitro* и *in vivo*, несмотря на сходные коэффициенты седиментации, различен (табл. 2) [25–27].

Комбинацией методов радиоактивного импульсного мечения рибосом с хромато-масс-спектрометрией было показано, что сборка 50S субчастицы рибосомы *in vivo* представляет собой более сложный процесс, чем полагали ранее [19]. Можно выделить шесть типов интермедиатов процесса сборки. Первая группа содержит белки L20, L21, L22, L24, связывающиеся с 5'-доменом 23S рНК. Во вторую входят интермедиаты, которые содержат белки L1, L3, L4, L13, L15, L17, L23. Интермедиаты третьей группы образуются с участием L5, L18, L29 и L34. Белки L14, L2, L19 и L32

входят в состав четвертой группы, а L6, L9, L11, L28 и L33 – пятой. На заключительной стадии сборки субчастицы связываются белки L30, L31, L35, L36 (рис. 7б). В отличие от направленной сборки 30S субчастицы (от 5'- к 3'-концу) сборка 50S субчастицы происходит гораздо менее упорядоченно. Дополнительную сложность вносит продолжительность сборки 50S субчастицы, большая чем у 30S [19].

БЕЛКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В СБОРКЕ РИБОСОМЫ

Хотя во внеклеточной системе можно реконструировать рибосомные субчастицы бактерий только из рНК и рибосомных белков, однако для этого требуются нефизиологические концентрации ионов и повышенная температура. Скорость сборки рибосом во внеклеточной системе и внутри живых клеток также несравнима. Дело в том, что в клетках сборке помогает множество специализированных белков. Эти белки, функция которых сходна с функцией шаперонов, необходимы при сборке рибосомы, так как они помогают дополнительно структурировать рНК. Эти белки разделяют процесс сборки на несколько этапов, организуя сверточные точки (check-point) (рис. 9).

С использованием комбинации методов радиоактивного импульсного мечения и хромато-масс-спектрометрии в составе интермедиатов сборки рибосом обнаружены 15 факторов с известной функцией и шесть факторов, функции которых до сих пор не определены (FkpA, YfdQ, YdiJ, YggL, YqiC, YbhC) [19].

Факторы сборки особенно важны в случае 50S субчастицы, так как процесс ее сборки более сложен, чем у 30S субчастицы (табл. 3, рис. 4, 7, 9) [13].

Таблица 2. Содержание белков в интермедиатах сборки 30S субчастицы *in vivo* и *in vitro*

Белок	<i>In vitro</i> интермедиат (33/41S)	<i>In vivo</i> интермедиат p ₁ 50S (32S)	<i>In vivo</i> интермедиат p ₂ 50S (43S)
L1	+	+	+
L2	+	–	–
L3	+	–	+
L4	+	+	+
L5	+	+	+
L6	–	–	–
L7	+	–	+
L9	+	+	+
L10	+	+	+
L11	+	–	+
L13	+	+	+
L14	–	–	+
L15	+	–	+
L16	–	–	–
L17	+	+	+
L18	+	+	+
L19	–	–	+
L20	+	+	+
L21	+	+	+
L22	+	+	+
L23	+	–	+
L24	+	+	+
L25	–	+	+
L27	–	+	+
L28	–	–	–
L29	+	+	+
L30	–	+	+
L31	–	–	–
L32	–	–	–
L33	+	–	+
L34	+	Не известен	Не известен
L35	Не известен	Не известен	Не известен
L36	Не известен	Не известен	Не известен

Хеликазы

Среди факторов сборки можно выделить группу родственных РНК-хеликаз с консервативным доменом, который встречается как в бактериальных, так и в эукариотических белках. Этот домен состоит примерно из 350 аминокислотных остатков, содержит 9 консервативных мотивов, один из которых, Asp-Glu-Ala-Asp (англ. D-E-A-D), дал название всему домену. Изучение хеликаз *in vitro* показало, что они обладают РНК-зависимой АТР-зависимой активностью [28]. Возможно, что группа хеликаз выполняет несколько функций, включая раскручивание локально образованной вторичной структуры РНК, участие в РНК-белковых взаимодействиях, а также шаперонную функцию. В *E. coli* обнаружены пять представителей семейства D-E-A-D-хеликаз – SrmB, CsdA, DbpA, RhlE, RhlB, причем четыре из них участвуют непосредственно в биогенезе рибосом [29].

Делеция гена *srmB*, кодирующего белок SrmB – супрессор инактивации гена рибосомного белка L24, вызывает медленный рост клеток при низкой температуре (<30°C), увеличение количества свободных 30S и 50S субчастиц и их предшественников. SrmB обычно взаимодействует с 40S субчастицей, т.е. действует на раннем этапе биогенеза рибосом (рис. 9).

Известно, что SrmB образует комплекс с рибосомными белками L4 и L24, необходимыми для образования первого *in vitro* интермедиата. Белок холодового шока CsdA, по-видимому, участвует в созревании обеих рибосомных субчастиц. CsdA супрессирует температурочувствительные мутации в рибосомном белке S2, он необходим для нормального роста клеток при температуре ниже 30°C. В то же время, белок ассоциирован с предшественником 50S субчастиц, и в биогенезе 50S субчастицы он действует после SrmB [30–32]. В отсутствие этого белка рост клеток замедляется, а количество свободных субчастиц увеличивается, а количество полисом уменьшается [28–32].

На основании многочисленных исследований предложена модель взаимодействия факторов SrmB, CsdA и RhlE. Присутствие/делеция RhlE сдвигает равновесие либо в сторону связывания SrmB с 50S субчастицей, либо в сторону связывания CsdA с 50S субчастицей (рис. 10) [33].

Белок DbpA – это АТР-зависимая хеликаза, которая активируется при взаимодействии со спиралью 92 23S рРНК. Делеция гена этого белка не сказывается на скорости роста бактерий, однако его повышенная экспрессия влияет на скорость роста и сборку рибосом: увеличивается количество свободных субчастиц, меняется состав предшественников 50S. DbpA участвует в последней стадии сборки рибосомы [29].

Шапероны

Белки DnaJ, DnaK, GrpE относятся к шаперонам, необходимым для сборки рибосомы. Штаммы *E. coli* с делецией генов *dnaJ* или *dnaK* растут медленнее и имеют дефекты сборки рибосом [34–36]. В этих штаммах при температуре выше 42°C предшественник 30S субчастицы имеет коэффициент седиментации 21S, а два предшественника 50S субчастицы – 32S и 45S, причем они медленнее созревают до полноценных рибосомных субчастиц. Все эти дефекты могут быть частично компенсированы повышенной экспрессией генов белков теплового шока *groEL* и *groES*. GroEL необходим для полного созревания 45S предшественника в 50S субчастицу рибосомы, но не участвует в формировании 30S субчастицы [35].

Белок холодового шока RbfA необходим для роста клеток при низкой температуре (рис. 10, рис. 11). RbfA взаимодействует с 5'-концевой спиралью 16S рРНК, он ассоциирован с 30S субчастицами, 70S рибосомами и полисомами. Клетки, в которых отсутствует RbfA, не могут адаптироваться к низким температурам, в них изменен рибосомный профиль и существенно повышено количество предшественника 16S рРНК. Фенотипические про-

явления делеции RbfA могут компенсироваться повышенной экспрессией ГТРаза Era [37].

Фактор созревания малой субчастицы рибосомы RimM также способствует эффективному процессингу 16S рРНК. Делеция этого фактора приводит к накоплению предшественников 16S рРНК. Другие белки, участвующие в созревании 3'-конца 16S рРНК, до сих пор не известны. RimM участвует в созревании 3'-конца рРНК, взаимодействуя со спиралью 31 и 33b 16S рРНК и рибосомными белками S13 и S19. Возможно, он облегчает взаимодействие белка S13 со спиралью 31 и белка S19 со спиралью 33b. С использованием внеклеточной системы показано, что преинкубирование RimM с 16S рРНК улучшает связывание рибосомных белков S9, S19, S10 и S3 с 3'-доменом 16S рРНК, но, к удивлению, ухудшает связывание с ним рибосомного белка S13 [21].

Белок RimP кодируется тем же опероном, что и RbfA, и участвует в созревании 30S субчастицы. У мутанта с делецией *rimP* количество свободных субчастиц выше, чем в клетках дикого типа. Преинкубация с RimP способствует связыванию 16S рРНК и рибосомных белков S5 и S12, а также S9, S3, S7 и S10, взаимодействующих с 3'-доменом 16S рРНК.

Таблица 3. Факторы сборки рибосомы и эффекты делеции их генов

Белок	Субчастица рРНК, с которой ассоциирован фактор сборки	Фенотип делеции гена		
		предшественник	незрелая 16S рРНК	незрелая 23S рРНК
CgtA _E	30S, 50S, 16S, 23S рРНК	40S при высокой ионной силе	Увелич.	Увелич.
CsdA	40S	40S		Увелич.
DbpA	Фрагмент 23S рРНК			
Der	50S	21S, 32S, 45S	Увелич.	Увелич.
DnaK-DnaJ			Увелич.	
Era	16S рРНК, 30S		Увелич.	
GroEL-GroES				
KsgA				
RbfA	30S		Увелич.	
RhlE	70S			
RimJ	Пре-30S			
RimM	30S		Увелич.	
RimP	30S		Увелич.	
RrmJ		40S		Увелич.
RsgA	30S		Увелич.	
SrmB	40S	40S	Увелич.	Увелич.
YihI	40S			

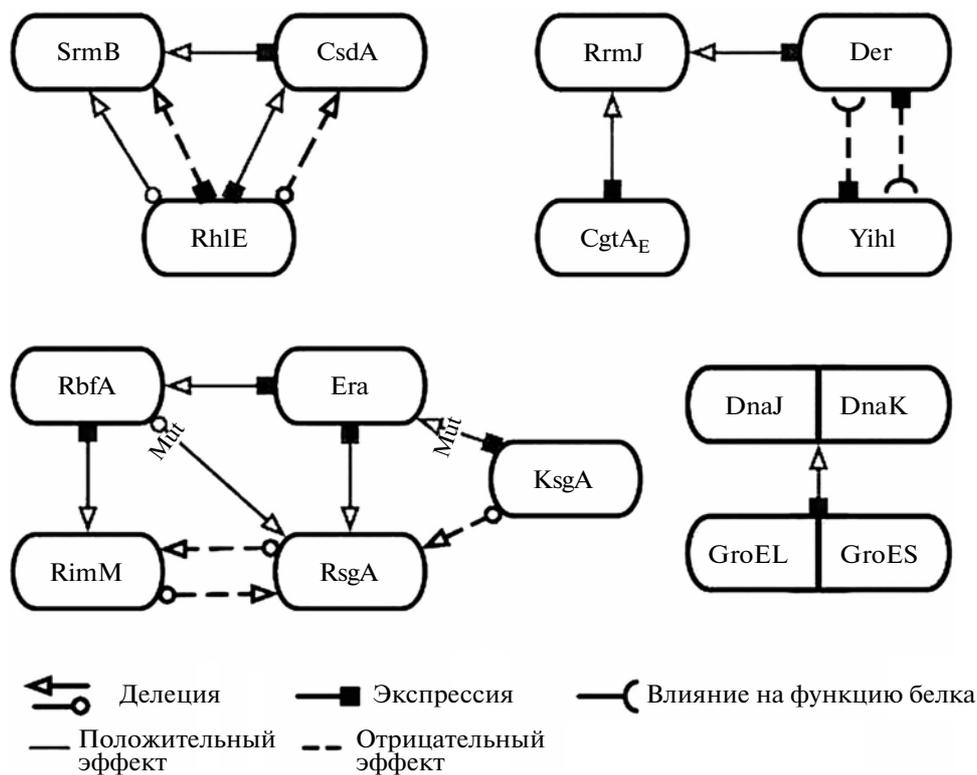


Рис. 10. Взаимодействие факторов сборки рибосомы. Типы функциональных взаимодействий каталогизированы под рисунком (согласно [33] с модификациями).

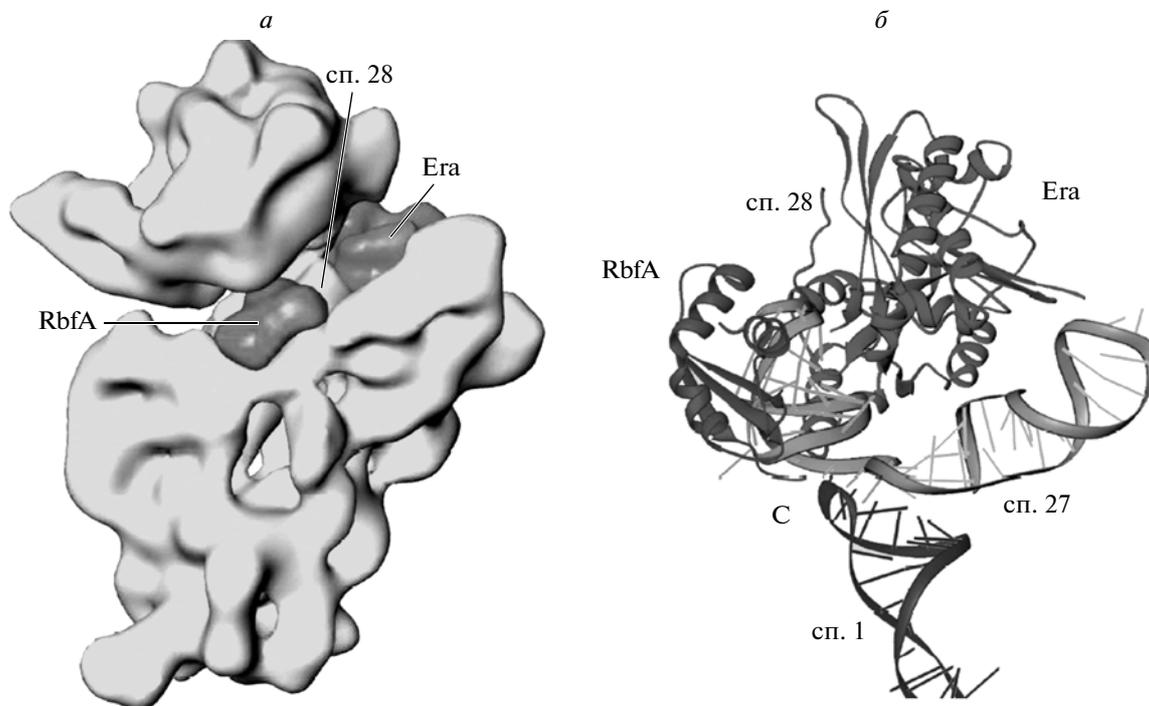


Рис. 11. Связывание белков RbfA и Era с 30S субчастицей рибосомы. Представлена структура комплекса 30S субчастицы с RbfA и Era, определенная с помощью криоэлектронной микроскопии (а). Проволочная модель взаимодействия RbfA и Era с участком 16S рРНК (б). сп. 1, 27, 28 – обозначение спиралей 1, 27 и 28 30S субчастицы рибосомы (согласно [37] с модификациями).

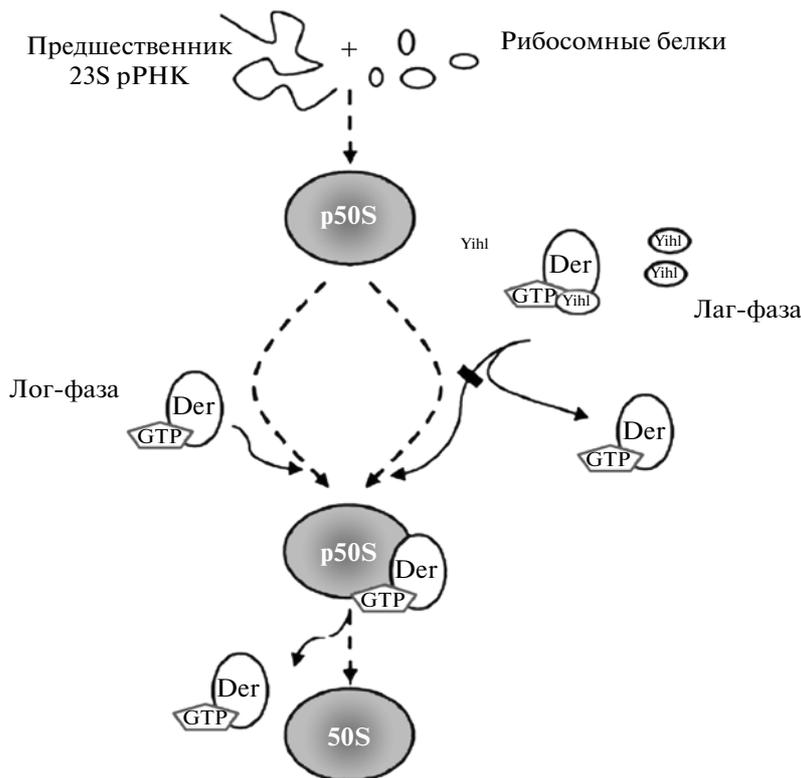


Рис. 12. Схематическая модель, описывающая роль Der и YihI в процессе биогенеза 50S субчастиц. p50S – предшественник 50S субчастицы (согласно [40] с модификациями).

RimJ действует как супрессор фенотипа холодового шока, обычно он ассоциирован с рибосомным белком S5. Субстратом для RimJ служит предшественник 30S субчастицы. Считается, что RimJ связывается после взаимодействия белка S4 с 5'-доменом, но до связывания S3 с 3'-доменом 16S рРНК [21].

ГТРазы

Era – консервативная ГТРаза, которая может специфически связываться как с 16S рРНК, так и с 30S субчастицей рибосомы *in vitro* (рис. 10, рис. 11). Делеция гена, кодирующего этот белок, вызывает уменьшение количества полисом и накопление предшественника 16S рРНК. Повышение уровня РНК-метилтрансферазы KsgA может супрессировать фенотип делеции *era*. Era в 2 раза увеличивает скорость связывания 16S рРНК и рибосомных белков S9, S11, S5 и S12 и менее значительно влияет на взаимодействие белков S13, S14 и S19 с 3'-доменом 16S рРНК во внеклеточной системе [38].

RsgA представляет собой ГТРаду, активность которой стимулируется 30S субчастицами или 70S рибосомами. В присутствии негидролизованного аналога ГТР (гуанилилимидодифосфата, GMP-PNP) большинство рибосомных субчастиц находятся в диссоциированной форме, и RsgA со-

осаждается с 30S субчастицами. Наоборот, в отсутствие ГТР или GDP RsgA не связывается ни с 30S субчастицами, ни с 70S рибосомами. Возможно, комплекс RsgA с ГТР связывается с неправильно собранными 30S субчастицами в составе 70S рибосом, вызывает конформационные изменения, что приводит к диссоциации рибосомы на субчастицы. Делеция *rsgA* вызывает замедление роста клеток, увеличение количества свободных субчастиц, накопление предшественника 16S рРНК. Интересно, что как делеция *rsgA*, так и инактивация его способности гидролизовать ГТР приводит к возникновению устойчивости к стрессу, вызванному высокой концентрацией соли. Повышенная экспрессия *era* компенсирует последствия делеции *rsgA* [39].

Белок Der – ГТРаза, входящая в одно семейство с белком Era. Der содержит два домена, отвечающих за связывание с ГТР и расположенных в N-концевой части белка. При температуре 42°C наблюдается инактивация обоих ГТР-связывающих доменов. Der взаимодействует с 50S субчастицами в присутствии негидролизованного аналога ГТР, но не GDP. Делеция *der* приводит к увеличению количества диссоциированных субчастиц и накоплению предшественников 16S и 23S рРНК [41]. Недавно был обнаружен белок YihI, ассоциированный с Der, функция которого за-

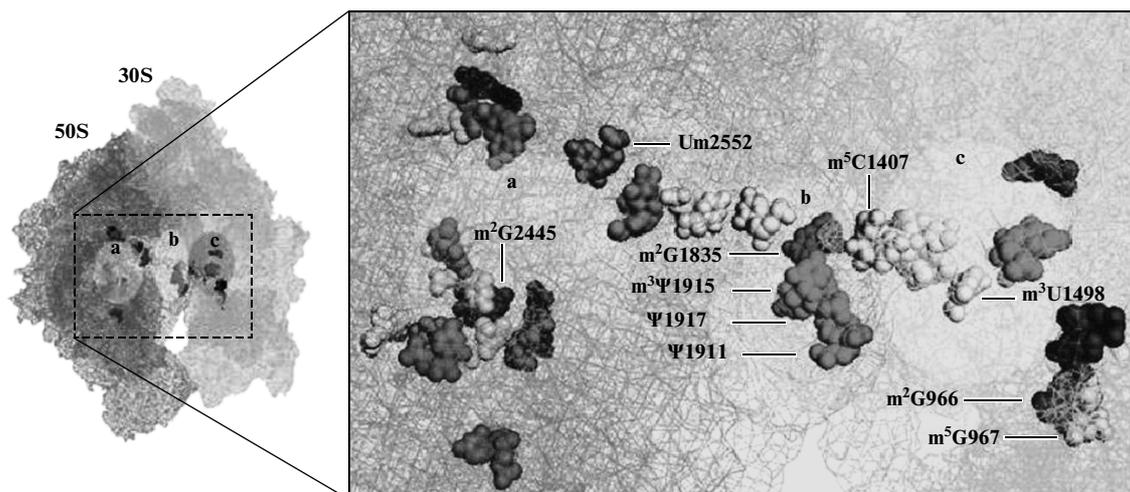


Рис. 13. Распределение модифицированных нуклеотидов в 70S рибосоме. Обозначены функционально важные части рибосомы: 50S субчастица – темно-серая, 30S субчастица – серая; а – пептидилтрансферазный центр, b – место контакта двух субчастиц, с – декодирующий центр. Показаны стрелками и подписаны несколько важнейших модифицированных нуклеотидов (согласно [45] с модификациями).

ключается в стимуляции ГТРазной активности Deg, причем YihI связывается с Deg в соотношении 1 : 1. Можно предположить, что YihI является регулятором Deg, так как при повышенной экспрессии YihI ингибируется функционирование Deg (рис. 10, рис. 12), а также сборка 50S субчастиц. При этом происходит накопление непроецессированных 16S, 23S и предшественников 5S рРНК, причем L9, L18 и L25 хуже связываются с 23S рРНК. Появление избытка Deg компенсирует эффекты, наблюдаемые при повышенной экспрессии YihI [40]. Считается, что YihI взаимодействует с Deg в лаг-фазе клеточного роста, вызывая диссоциацию комплекса Deg с 50S субчастицами. В экспоненциальной фазе количество YihI снижается, а свободного Deg, связанного с GTP, возрастает, и Deg способствует завершению сборки 50S субчастицы [42].

Консервативная ГТРаза CgtAE связывается как с 30S, так и с 50S субчастицами рРНК в присутствии гуанилилимидодифосфата. *In vitro* CgtAE соосаждается с 16S и 23S рРНК в присутствии GTP и взаимодействует с рибосомными белками S3, S4, S5, S13, S16, L2, L4, L16 и L17, как и белок CsdA [43]. Делеция *cgtAE* приводит к увеличению количества свободных 30S и 50S субчастиц, ошибкам в процессинге 16S и 23S рРНК и отсутствию белков L16, L33, L34 в 50S субчастицах. Во внеклеточной системе CgtAE взаимодействует только со зрелой формой 50S субчастиц и не связывается с предшественниками, что свидетельствует о его участии в заключительных стадиях сборки 50S субчастицы в клетке [44].

МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ рРНК И РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

В клетках *E. coli* транспортная и рибосомная РНК (за исключением 5S рРНК) подвергаются ковалентной модификации в процессе созревания. Модифицированные нуклеотиды сосредоточены в функционально важных частях рибосомы – в пептидилтрансферазном центре, участках связывания тРНК, в месте контакта двух субчастиц (рис. 13).

Субстратами модифицирующих ферментов могут быть рРНК, интермедиаты сборки и собранные субчастицы рибосомы. Большинство модифицированных нуклеотидов консервативные, однако их функции еще не полностью изучены. Модификации изменяют химические свойства нуклеотидов, что может влиять на процесс сборки рибосом. Например, вводимая при метилировании гидрофобная группа может влиять на стабильность укладки рРНК. Псевдоуридилирование, повышающее гидрофильность и улучшающее стекинг-взаимодействия, выполняет, возможно, функцию молекулярного клея для фиксации функциональной конформации РНК, что имеет большое значение для дальнейшей ориентации лигандов в процессе трансляции. Одна из возможных функций модификации рРНК – создание сверточных точек сборки субчастиц, так как каждый из ферментов, осуществляющих модификацию, предпочитает достаточно узкий интервал интермедиатов сборки [46].

Обнаружено, что некоторые рибосомные белки подвергаются, как и рРНК, ферментативным модификациям [47–53]. Белки S11, L3, L7/L12, L16 и L33 содержат монометилированные аминокислотные остатки, а белок L11 – три триметилированных остатка. Белки S5, S18 и L12 содержат

ацетилированные аминокислоты. Причем ацетилированную форму белка L12 исторически называют L7. Соотношение L7/L12 зависит от фазы роста клеток [54]. Белок малой субчастицы S6 модифицирован четырьмя добавленными остатками глутаминовой кислоты, а S11 не только метилирован – примерно половина молекул этого белка содержит изоаспарат [53].

Модификации компонентов рибосомы в некоторых случаях могут играть роль молекулярных переключателей. Так, метилтрансфераза KsgA модифицирует нуклеотиды A1518 и A1519 16S рРНК только при удачном завершении сборки, что создает своеобразную сверочную точку сборки малой субчастицы [56].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прошло больше 50 лет с момента открытия и начала изучения структуры и функции рибосом. Сначала состав и процесс сборки рибосомы изучали методом реконструкции *in vitro*. Таким образом были получены карты Номуры, данные о порядке связывания рибосомных белков. Развитие структурных методов позволило углубить и расширить знания о процессе сборки рибосомы [1]. Однако до сих пор ученые находят новые факторы, участвующие в сборке рибосомы в условиях стресса, еще не до конца изучена роль интермедиатов сборки. Интересной задачей может стать создание антибактериальных препаратов, подавляющих сборку рибосом бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yusupov M. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 angstrom resolution. *Science*. **292**, 883–896.
2. Wimberly B. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **407**, 327–339.
3. Cerretti D. 1983. The *spc* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a protein export gene. *Nucl. Acids Res.* **11**, 2599–2616.
4. Paul B. 2004. rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 749–770.
5. Cannone J. 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*. **3**, 2.
6. Wimberly B. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **407**(6802), 327–339.
7. Sykes M. 2009. Complex assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Annu. Rev. Biophys.* **38**, 197–215.
8. Williamson J. 2003. After the ribosome structure: how are the subunits assembled? *RNA*. **9**, 165–167.
9. Liiv A. 2004. Importance of transient structures during post-transcriptional refolding of the pre-23S rRNA and ribosomal large subunit assembly. *J. Mol. Biol.* **342**, 725–741.
10. Young R. 1978. Complementary sequences 1700 nucleotides apart from a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**, 3593–3597.
11. Ghora B. 1979. Identification of a novel RNA molecule in a new RNA processing mutant of *Escherichia coli* which contains 5S ribosomal RNA sequences. *J. Biol. Chem.* **254**, 1951–1956.
12. Li Z. 1995. The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 6883–6886.
13. Shajani Z. 2011. Assembly of bacterial ribosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 501–526.
14. Held W. 1973. Reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from purified molecular components. *J. Biol. Chem.* **248**, 5720–5730.
15. Jagannathan I. 2003. Assembly of the central domain of the 30S ribosomal subunit: roles for the primary binding ribosomal proteins S15 and S8. *J. Mol. Biol.* **330**, 373–383.
16. Jagannathan I. 2004. Ribosomal protein dependent orientation of the 16S rRNA environment of S15. *J. Mol. Biol.* **335**, 1173–1185.
17. Nierhaus K. 1980. The assembly of the prokaryotic ribosome. *BioSystems*. **12**, 273–282.
18. Mulder A. 2010. Visualizing ribosome biogenesis: parallel assembly pathways for 30S subunit. *Science*. **330**(6004), 673–677.
19. Chen S. 2012. Characterization of the ribosome biogenesis landscape in *E. coli* using quantitative mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* **425**(4), 767–779.
20. Held W. 1973. Rate determining step in the reconstitution of *E. coli* 30S ribosomal subunits. *Biochemistry*. **12**, 3273–3281.
21. Bunner A. 2010. The effect of ribosome assembly cofactors on *in vitro* 30S subunit reconstitution. *J. Mol. Biol.* **398**, 1–7.
22. Talkington M. 2005. An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **438**, 628–632.
23. Nierhaus K. 1974. Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal-subunits from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **71**, 4713–4717.
24. Sieber G. 1978. Kinetic and thermodynamic parameters of assembly *in vitro* of large subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *Biochemistry*. **17**, 3505–3511.
25. Hayes F. 1971. Biosynthesis of ribosomes in *E. coli*. I. Properties of ribosomal precursor particles and their RNA components. *Biochimie*. **53**, 369–382.
26. Lindahl L. 1973. Two new ribosomal precursor particles in *E. coli*. *Nat. New Biol.* **243**, 170–172.
27. Lindahl L. 1975. Intermediates and time kinetics of *in vivo* assembly of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* **92**, 15–37.
28. Tanner N. 2003. The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell*. **11**, 127–138.
29. Elles L. 2009. A dominant negative mutant of the *E. coli* RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. *Nucl. Acids Res.* **37**, 6503–6514.
30. Charollais J. 2003. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal sub-

- units in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**, 1253–1265.
31. Charollais J. 2004. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucl. Acids Res.* **32**, 2751–2759.
 32. Jagessar K. 2010. Functional and molecular analysis of *Escherichia coli* strains lacking multiple DEAD-box helicases. *RNA.* **16**, 1386–1392.
 33. Jain C. 2008. The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA.* **14**, 381–389.
 34. Al Refa'i A. 2009. Ribosome biogenesis is temperature-dependent and delayed in *Escherichia coli* lacking the chaperones DnaK or DnaJ. *Mol. Microbiol.* **71**, 748–762.
 35. El Hage A. 2001. The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 796–808.
 36. Alix J. 1993. Mutant DnaK chaperones cause ribosome assembly defects in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 9725–9729.
 37. Olins P.O. 1981. Translational regulation by ribosomal protein S8 in *Escherichia coli*: structural homology between rRNA binding site and feedback target on mRNA. *Nucl. Acids Res.* **9**, 1757–1764.
 38. Britton R. 2009. Role of GTPases in bacterial ribosome assembly. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 155–176.
 39. Himeno H. 2004. A novel GTPase activated by the small subunit of ribosome. *Nucl. Acids Res.* **32**, 5303–5309.
 40. Hwang J. 2010. A bacterial GAP-like protein, YihI, regulating the GTPase of Der, an essential GTP-binding protein in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **399**, 759–772.
 41. Hwang J. 2001. An essential GTPase, Der, containing double GTP-binding domains from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* **276**, 31415–31421.
 42. Hwang J. 2006. The tandem GTPase, Der, is essential for the biogenesis of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1660–1672.
 43. Jiang M. 2006. The *Escherichia coli* GTPase CgtAE is involved in late steps of large ribosome assembly. *J. Bacteriol.* **188**, 6757–6770.
 44. Woodson S. 2008. RNA folding and ribosome assembly. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**(6), 667–673.
 45. Chow C. 2007. Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with posttranscriptional modifications. *ACS Chem. Biol.* **2**(9), 610–619.
 46. Hou Y. 2010. Stereochemical mechanisms of tRNA methyltransferases. 2010. *FEBS Lett.* **584**, 278–286.
 47. Colson C. 1979. Genetics of ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*. III. Map position of two genes, *prmA* and *prmB*, governing methylation of proteins L11 and L3. *Mol. Gen. Genet.* **169**, 245–250.
 48. Cashel M. 1996. Regulation of ribosome synthesis. in *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Ed. Neidhardt F.C. Washington, DC: ASM Press.
 49. David C. 1999. Isoaspartate in ribosomal protein S11 of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 2871–2877.
 50. Arnold R. 1999. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **269**, 105–112.
 51. Kowalak J. 1996. Methylthio-aspartic acid: identification of a novel posttranslational modification in ribosomal protein S12 from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **5**, 1625–1632.
 52. Brosius J. 1976. The primary structure of protein L16 located at the peptidyltransferase center of *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Lett.* **68**, 105–109.
 53. Holmes K. 2004. Mapping structural differences between 30S ribosomal subunit assembly intermediates. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 179–186.
 54. Nesterchuk M. 2011. Posttranslational modifications of ribosomal proteins in *Escherichia coli*. *Acta Naturae.* **3**(2), 22–33.
 55. Isono S. 1981. Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. III. Studies of mutants lacking an acetylase activity specific for protein L12. *Mol. Gen. Genet.* **183**(3), 473–477.
 56. Connolly K. 2008. Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA. *Mol. Microbiol.* **70**(5), 1062–1075.