

УДК 577.213/.217

Вклад рибосомного белка S1 в структуру и функцию Q β -репликазы

З. Ш. Кутлубаева, Е. В. Четверина, А. Б. Четверин*

Институт белка РАН, 142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 4

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

Поступила в редакцию 07.07.2016

Принята к печати 09.11.2016

РЕФЕРАТ Кристаллическая структура бактериальной рибосомы была решена с высоким разрешением более 10 лет назад, однако она не содержит информации о структуре самого большого рибосомного белка – S1. Этот необычный белок состоит из шести гибко сочлененных доменов, поэтому он не имеет фиксированной структуры, что мешает образованию кристаллов. Белок S1 является не только компонентом рибосомы, но и одной из четырех субъединиц Q β -репликазы – РНК-зависимой-РНК-полимеразы бактериофага Q β . Считалось, что в обоих случаях роль этого РНК-связывающего белка состоит в удержании матрицы вблизи активного центра фермента. В последние годы был совершен прорыв в исследовании белка S1 в составе Q β -репликазы. В частности, обнаружена его парадоксальная способность вытеснять РНК из репликазного комплекса и установлена кристаллическая структура его фрагмента, способного выполнять эту функцию. Новые результаты заставляют переосмыслить вклад белка S1 в структуру и функцию рибосомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериофаг Q β , инициация, кристаллическая структура, ОВ-домен, рибосомный белок S1, репликация РНК, РНК-зависимая-РНК-полимераза, терминация.

ВВЕДЕНИЕ

Находящийся на малой (30S) субчастице белок S1 не только является самым большим белком рибосомы *Escherichia coli*, но и имеет необычную структуру [1]. В то время как другие рибосомные белки формируют компактные глобулы [2, 3], белок S1 представляет собой гибкую цепь [4, 5], почти такую же длинную, как рибосома [1], и состоящую из шести структурно подобных звеньев [6], называемых ОВ-доменами (от Oligonucleotide/oligosaccharide Binding [7]).

Белок S1 жизненно важен для клетки, так как делеции или амбер-мутации его гена *rpsA* являются летальными [8, 9]. Однако точная функция белка S1 в рибосоме до сих пор не известна; не известно и то, как расположены в рибосоме его структурные звенья. Известно лишь, что N-концевой сегмент белка взаимодействует с белком S2, находящимся между головкой и платформой 30S субчастицы [10]. Не помогло прояснить ситуацию и решение кристаллической структуры рибосомы, так как удалось закристаллизовать лишь рибосомы, полностью лишенные белка S1 [3]. По-видимому, этот белок, не имеющий фиксированной конфигурации, мешает кристаллизации рибосом.

Не вызывает сомнений, что обладающий выраженными РНК-связывающими свойствами белок S1 важен для инициации трансляции [1, 11]. Но не менее очевидно и то, что стадией инициации участие белка S1 в трансляции не ограничивается, так как, в отли-

чие от факторов инициации, белок S1 присутствует в рибосоме в стехиометрических количествах и остается связанным с рибосомой во время элонгации синтезируемого полипептида [1].

Помимо собственно синтеза белка, белок S1 участвует в других процессах, происходящих в клетке – как на рибосоме, так и вне ее [11]. Одна из наиболее известных внерибосомных функций белка S1 – участие в синтезе РНК в виде α -субъединицы Q β -репликазы, РНК-зависимой-РНК-полимеразы бактериофага Q β . Помимо белка S1, Q β -репликаза содержит кодируемую геномом фага каталитическую β -субъединицу, а также факторы элонгации трансляции EF-Tu и EF-Ts (γ - и δ -субъединицы соответственно) [12]. Субъединицы β , γ и δ составляют кор Q β -репликазы, с которым белок S1 связан относительно слабо (как и с рибосомой [1]) и частично диссоциирует в процессе выделения фермента [13].

Исследование белка S1 в составе Q β -репликазы дало в последние годы результаты, позволяющие существенно продвинуться в понимании структуры и функции этого белка. Эти результаты и являются предметом настоящего обзора.

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА S1

«Классический» ОВ-домен состоит из ≈ 70 аминокислотных остатков и представляет собой «бочонок», образованный пятью уложенными в виде греческого ключа β -тяжами и обычно прикрытый α -спиралью

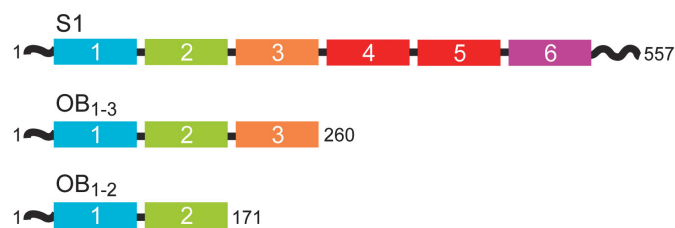
[7, 14]. ОВ-домены присутствуют в структуре многих белков, способных связывать полинуклеотиды и полисахариды [15]. Анализ аминокислотной последовательности [6] позволил сделать вывод, что в белке S1 присутствует шесть ОВ-доменов (рисунки). Последующие структурные исследования подтвердили этот вывод с одним уточнением: N-концевой ОВ-домен (ОВ₁) содержит не пять, а четыре β-тяжа [10, 16–18].

Название ОВ-домена предполагает, что он должен обладать сродством к полинуклеотидам. Действительно, показано, что домены ОВ₃–ОВ₆ обладают РНК-связывающими свойствами [1, 16, 19]. В то же время считалось, что домены ОВ₁ и ОВ₂ не способны связывать РНК, а вовлечены в белок-белковые взаимодействия, обеспечивающие связывание белка S1 с рибосомой и кором Qβ-репликазы [1]. Недавно было показано, что домены ОВ₁ и ОВ₂ действительно образуют контакты с кором Qβ-репликазы [17, 18]. Кроме того, домен ОВ₂ способен взаимодействовать с РНК благодаря высокой концентрации положительно заряженных остатков на участке поверхности, не вовлеченной в белок-белковые взаимодействия [18]. Таким образом, все пять классических ОВ-доменов белка S1 обладают РНК-связывающими свойствами.

Особая роль принадлежит N-концевому сегменту, предшествующему домену ОВ₁ и состоящему из 20 аминокислотных остатков. В несвязанном состоянии этот сегмент не имеет структуры [20], однако приобретает α-спиральную конфигурацию при взаимодействии с рибосомным белком S2 [10] и с кором Qβ-репликазы [17, 18], причем в последнем случае эта спираль на виток длиннее. По-видимому, N-концевая α-спираль вносит основной вклад во взаимодействие белка S1 с кором Qβ-репликазы. Это следует как из кристаллографических данных [17, 18], так и из экспериментов по гель-фильтрации белковых комплексов. Оказалось, что выход комплекса белка S1 или его фрагмента с кором Qβ-репликазы резко падает, если эта спираль удалена (З.Ш. Кутлубаева, П. Северин и А.Б. Четверин, неопубликованные данные).

БЕЛОК S1 КАК ФАКТОР ТЕРМИНАЦИИ РЕПЛИКАЦИИ РНК

Qβ-репликаза знаменита своей уникальной способностью быстро размножать РНК. Подобно ПЦР, реакция имеет экспоненциальную кинетику: и исходная матрица, и ее комплементарная копия служат матрицами в следующем цикле репликации; благодаря этому число матриц возрастает в каждом цикле вдвое до тех пор, пока репликаза остается в моляр-



ном избытке. Однако эта реакция, в отличие от ПЦР, изотермична: нет надобности повышать температуру для расплавления дуплекса, так как непосредственным продуктом реакции является одноцепочечная РНК. Как Qβ-репликазе удастся осуществлять копирование РНК по принципу комплементарности, но сохранять матрицу и растущую цепь одноцепочечными, остается одной из неразрешенных загадок репликации фага Qβ [12].

В 1972 году Ч. Вайссмани и сотр. опубликовали работу [21], в которой утверждалось, что белок S1 нужен Qβ-репликазе только для инициации копирования геномной (плюс) цепи РНК фага Qβ и не нужен для копирования других матриц репликазы, в том числе минус-цепи Qβ РНК и малых реплицирующихся РНК («6S» или RQ РНК, от Replicable by Qβ replicase). Вскоре первый автор этой работы опубликовал обзор, в котором, ссылаясь на свои неопубликованные результаты, утверждал, что белок S1 не нужен также и на стадиях элонгации и терминации минус-цепи, образующейся при копировании плюс-цепи Qβ РНК [22]. Этот взгляд на роль белка S1 в репликации РНК продержался в течение последующих 40 лет.

Свои результаты Вайссманн и сотр. получили в условиях, когда концентрации Qβ-репликазы и матрицы были близки, и экспоненциальный синтез РНК был невозможен. Мы обнаружили, что совсем другой результат получается в условиях большого избытка репликазы. Оказалось, что при этом белок S1 многократно стимулирует репликацию не только Qβ РНК, но и RQ РНК. Выяснилось, что в присутствии белка S1 большая часть продукта представлена одноцепочечной РНК, тогда как в его отсутствие – двухцепочечной [23]. Создавалось впечатление, что белок S1 помогает репликазе поддерживать одноцепочечное состояние матрицы и растущей цепи РНК благодаря известной способности связывать одиночные цепи РНК и расплавлять дуплексы [24].

Чтобы проверить это предположение, мы исследовали состояние РНК в процессе элонгации в присутствии и в отсутствие белка S1. В качестве матрицы использовали плюс-цепь Q β РНК длиной 4217 нуклеотидов, копирование которой при 30°C занимает около 4 мин. Чтобы исключить завышение количества двухцепочечной РНК в результате ее образования при денатурации репликативного комплекса [25], состояние РНК определяли до стадии фенольной экстракции как РНК, устойчивую к рибонуклеазе T1. Оказалось, что как в присутствии, так и в отсутствие белка S1 синтезируемая цепь остается одноцепочечной в течение всей элонгации и даже некоторое время по ее завершении. Однако если в присутствии белка S1 наблюдали быстрый выход одноцепочечного полноразмерного продукта из репликативного комплекса, то в отсутствие белка S1 синтезированная цепь оставалась связанной с репликативным комплексом. Со временем меньшая ее часть спонтанно покидала комплекс в одноцепочечном состоянии, а большая часть образовывала дуплекс с матрицей и приобретала устойчивость к рибонуклеазе [23].

Этот результат показал, что белок S1 катализирует выход одноцепочечного продукта из активного центра Q β -репликазы. Иными словами, он выполняет функцию фактора терминации. По-видимому, эту функцию белок S1 выполняет при размножении любой законной матрицы [26] Q β -репликазы. В результате, как исходная матрица, так и ее комплементарная копия оказываются доступными для копирования в следующем цикле репликации, что создает условия для экспоненциального размножения РНК.

ДВЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА S1 ИМЕЮТ РАЗНУЮ СТРУКТУРНУЮ ОСНОВУ

Таким образом, белок S1 выполняет при репликации Q β РНК две функции: функцию фактора терминации, общую для всех законных матриц, и ранее представлявшуюся единственной, специальную функцию, выполняемую только при инициации на плюс-цепи.

Проведенное нами прямое исследование скорости инициации на плюс-цепи Q β РНК показало, что потребность в белке S1 не является абсолютной. В буфере с низкой концентрацией соли (50 мМ NaCl) инициация в отсутствие белка S1 происходит почти так же хорошо, как и в его присутствии. Однако добавление 50 мМ (NH₄)₂SO₄ приводит к практически полному подавлению инициации в отсутствие белка S1 и только к двукратному торможению в его присутствии (инициация на других законных матрицах подавляется приблизительно вдвое независимо от присутствия белка S1) [23]. Таким же эффектом обладает добавление 100 мМ любого другого одно-

валентного катиона независимо от природы аниона (З.Ш. Кутлубаева, Е.В. Четверина и А.Б. Четверин, неопубликованные данные). В силу сказанного, функцию белка S1 на стадии инициации мы называем антисолевой. По-видимому, при размножении фага Q β в клетках *E. coli* антисолевая функция используется наряду с терминационной, так как цитоплазматическая концентрация одновалентных катионов даже превышает 150 мМ [27].

Чтобы выяснить, все ли домены белка S1 необходимы для выполнения его функций, мы клонировали и очистили фрагменты белка S1, содержащие разное число ОВ-доменов, начиная с N-конца (рисунки). Оказалось, что фрагмент ОВ₁₋₂ может заменить белок S1 на стадии терминации, а фрагмент ОВ₁₋₃ – в защите стадии инициации от соли [23].

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ КОРА Q β -РЕПЛИКАЗЫ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ БЕЛКА S1

Как и при исследовании рибосомы, отсутствие у белка S1 фиксированной конформации не позволяло получить кристаллы холофермента Q β -репликазы. Эту проблему удалось преодолеть после того, как обнаружили, что относительно короткие (и, следовательно, менее гибкие) фрагменты способны заменять белок S1 во всех его функциях [23]. Ранее две команды (датско-российская и японская) независимо друг от друга решили кристаллическую структуру кора Q β -репликазы [28, 29]. Недавно те же команды независимо решили структуру комплекса, содержащего кор репликазы и два первых ОВ-домена белка S1 [17, 18, 30]. Хотя японская команда исследовала кристаллы комплекса кора репликазы с фрагментом ОВ₁₋₃ [17], а датско-российская – с фрагментом ОВ₁₋₂ [18], в обоих случаях была получена равноценная структурная информация, так как третий ОВ-домен не виден, поскольку не фиксирован в структуре комплекса [17]. Помимо вклада в понимание механизма репликации РНК, эти работы интересны тем, что впервые установлена кристаллическая структура 1/3 молекулы рибосомного белка S1, причем именно той ее части, структура которой была наименее изучена.

Связывание доменов ОВ₁ и ОВ₂ почти не влияет на структуру кора Q β -репликазы. Эти домены взаимодействуют с β -субъединицей в районе домена «пальцев», который участвует в формировании активного центра репликазы, связывании РНК и разведении комплементарных цепей репликативного комплекса [28, 31]. N-Концевая α -спираль белка S1 находится между доменами ОВ₁ и ОВ₂ и образует ряд контактов с β -субъединицей и EF-Tu [18]. Эти контакты аналогичны тем, которые та же спираль образует с рибосомным белком S2 [10].

Хотя две группы исследователей приводят почти идентичные структурные данные [17, 18], они делают несколько разные выводы. Так, японская группа утверждает, что домены OB_1 и OB_2 не имеют на своей поверхности положительно заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков, способных образовывать связи с фосфатами и азотистыми основаниями РНК, и поэтому не могут взаимодействовать с РНК [17]. Другая группа, напротив, указывает на существование протяженного участка поверхности домена OB_2 , несущего положительный заряд, и с помощью ЯМР выявляет способность этого домена связывать РНК [18].

ВКЛАД БЕЛКА S1 В ИНИЦИАЦИЮ РЕПЛИКАЦИИ РНК

Эта функция аналогична той, которой обычно наделяют белок S1, рассматривая его роль в трансляции. Разница в том, что, стимулируя инициацию трансляции подавляющего большинства мРНК [1, 11], белок S1 стимулирует инициацию репликации только одной из многих матриц Q β -репликазы. В отличие от других матриц, инициация на плюс-цепи Q β РНК требует, чтобы репликаза связалась не только с 3'-концом, с которого начинается ее считывание, но и с «M-сайтом» – внутренним участком, отстоящим от 3'-конца матрицы на ≈ 1500 нуклеотидов. В отсутствие белка S1 репликаза не может связаться с M-сайтом [32]. По-видимому, белок S1 стимулирует инициацию на плюс-цепи Q β РНК, повышая сродство репликазы к M-сайту. В пользу этого говорит и тот факт, что инициация становится чувствительной к повышенной концентрации соли как в отсутствие белка S1 [23], так и в его присутствии при наличии определенных мутаций в M-сайте [33]. Способность фрагмента OB_{1-3} , но не OB_{1-2} заменять белок S1 в антисолевой функции означает, что третий OB-домен играет основную роль во взаимодействии с M-сайтом, а домены OB_1 и OB_2 нужны постольку, поскольку они формируют связь между доменом OB_3 и кором репликазы.

ВКЛАД БЕЛКА S1 В ТЕРМИНАЦИЮ РЕПЛИКАЦИИ РНК

Японская группа предложила механизм действия белка S1, в котором ключевая роль в инициации и терминеции принадлежит подвижному домену OB_3 , взаимодействующему на стадии инициации с M-сайтом плюс-цепи Q β РНК, а на стадии терминеции – с новосинтезированной цепью РНК [17, 34]. Хотя при этом авторы цитируют нашу статью [23], читали они ее, как видно, невнимательно, поскольку там прямо показано, что на стадии терминеции белок S1 может быть заменен фрагментом OB_{1-2} , в котором домен OB_3 отсутствует, а следовательно, играть ре-

шающую роль не может (как, впрочем, не заметили они и того факта, что в той же статье на полтора года раньше них продемонстрирована решающая роль домена OB_3 на стадии инициации).

В датско-российской работе показано, что область с высокой плотностью положительного заряда домена OB_2 непосредственно примыкает к подобной же области на поверхности β -субъединицы и образует с ней непрерывный положительно заряженный тракт, ведущий от отверстия, предназначенного для выхода синтезированной цепи из активного центра [18]. Вероятно, этот тракт существует для выхода синтезированной цепи из репликативного комплекса.

Однако детальный механизм терминеции предлагать еще рано, так как терминеция осуществляется в составе закрытой конформации Q β -репликазы [26], тогда как структура комплекса кора с фрагментом OB_{1-2} решена для открытой конформации. В этой связи отметим, что белок S1 катализирует терминецию, даже если он добавлен на стадии элонгации, но не после ее завершения [23]. Иными словами, где-то в конце стадии элонгации существует «точка невозврата», после которой белок S1 не может помочь выходу синтезированной цепи. Что это за точка?

В результате инициации на законной матрице с участием GTP Q β -репликаза переходит в закрытую конформацию, из которой ни матрица, ни ее комплементарная копия не могут диссоциировать пока не завершится элонгация [26]. Это обеспечивает высокую процессивность репликазы, но препятствует эвакуации ее активного центра по завершении синтеза копии. Чтобы обеспечить «рециклинг» фермента, необходимо осуществить обратный переход из закрытой конформации в открытую. Возможно, что этот переход индуцируется загадочным безматричным 3'-концевым аденилированием синтезированной цепи, которое предшествует ее терминеции [12] и представляет тот самый момент, до наступления которого белок S1 должен успеть встроиться в репликазу, чтобы выполнить функцию фактора терминеции.

В заключение отметим, что обнаружение способности белка S1 удалять РНК из комплекса изменяет базовую парадигму, согласно которой назначение этого белка состоит в удержании РНК вблизи активного центра фермента, будь то репликаза или рибосома [1], и заставляет переосмыслить возможную роль белка S1 в трансляции и иных клеточных процессах. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 14-14-00350).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Subramanian A.R. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 1983. V. 28. P. 101–142.
2. Spirin A.S., Serdyuk I.N., Shpungin J.L., Vasiliev V.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 10. P. 4867–4871.
3. Schuwirth B.S., Borovinskaya M.A., Hau C.W., Zhang W., Vila-Sanjurjo A., Holton J.M., Cate J.H. // *Science.* 2005. V. 310. № 5749. P. 827–834.
4. Chu Y.G., Cantor C.R. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6. № 6. P. 2363–2379.
5. Moore P.B., Laughrea M. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6. № 6. P. 2355–2361.
6. Gribskov M. // *Gene.* 1992. V. 119. № 1. P. 107–111.
7. Murzin A.G. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 3. P. 861–867.
8. Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1982. V. 185. № 3. P. 445–447.
9. Sorensen M.A., Frick J., Pedersen S. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 280. № 4. P. 561–569.
10. Byrgazov K., Grishkovskaya I., Arenz S., Coudevylle N., Temmel H., Wilson D.N., Djinoic–Carugo K., Moll I. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 1. P. 661–673.
11. Hajnsdorf E., Boni I.V. // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 7. P. 1544–1553.
12. Четверин А.Б. // *Молекуляр. биология.* 2011. Т. 45. № 1. С. 160–172.
13. Blumenthal T. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 60. P. 628–638.
14. Bycroft M., Hubbard T.J., Proctor M., Freund S.M., Murzin A.G. // *Cell.* 1997. V. 88. № 2. P. 235–242.
15. Draper D.E., Reynaldo L.P. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 2. P. 381–388.
16. Salah P., Bisaglia M., Aliprandi P., Uzan M., Sizun C., Bontems F. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 16. P. 5578–5588.
17. Takeshita D., Yamashita S., Tomita K. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 16. P. 10809–10822.
18. Gytz H., Mohr D., Seweryn P., Yoshimura Y., Kutlubaeva Z., Dolman F., Chelchessa B., Chetverin A.B., Mulder F.A., Brodersen D.E., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 22. P. 10893–10906.
19. Aliprandi P., Sizun C., Perez J., Mareuil F., Caputo S., Leroy J.L., Odaert B., Laalami S., Uzan M., Bontems F. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 19. P. 13289–13301.
20. Giraud P., Crechet J., Uzan M., Bontems F., Sizun C. // *Biomol. NMR Assign.* 2015. V. 9. № 1. P. 107–111.
21. Kamen R., Kondo M., Römer W., Weissmann C. // *Eur. J. Biochem.* 1972. V. 31. № 1. P. 44–51.
22. Kamen R. // *RNA Phages.* / Ed. Zinder N.D. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1975. P. 203–234.
23. Vasilyev N.N., Kutlubaeva Z.S., Ugarov V.I., Chetverina H.V., Chetverin A.B. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1781.
24. Kolb A., Hermoso J.M., Thomas J.O., Szer W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 6. P. 2379–2383.
25. Feix G., Slor H., Weissmann C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1967. V. 57. № 5. P. 1401–1408.
26. Ugarov V.I., Demidenko A.A., Chetverin A.B. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 45. P. 44139–44146.
27. Richey B., Cayley D.S., Mossing M.C., Kolka C., Anderson C.F., Farrar T.C., Record M.T., Jr. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 15. P. 7157–7164.
28. Kidmose R.T., Vasiliev N.N., Chetverin A.B., Andersen G.R., Knudsen C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 24. P. 10884–10889.
29. Takeshita D., Tomita K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 36. P. 15733–15738.
30. Olesen H., Knudsen C., Seweryn P., Brodersen D., Kutlubaeva Z., Chetverin A., Mulder F., Jensen L., Yoshimura Y. // *Acta Cryst.* 2014. V. A70. C1602.
31. Takeshita D., Tomita K. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 2. P. 229–237.
32. Meyer F., Weber H., Weissmann C. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 153. № 3. P. 631–660.
33. Schuppli D., Miranda G., Qiu S., Weber H. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 283. № 3. P. 585–593.
34. Tomita K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. № 9. P. 15552–15570.