

УДК 577.21

Посттрансляционные модификации рибосомных белков *Escherichia coli*

М. В. Нестерчук*, П. В. Сергиев, О. А. Донцова

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: nesterchuk.mihail@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

РЕФЕРАТ В клетках *Escherichia coli* ряд рибосомных белков подвергается посттрансляционной модификации: шесть белков метилированы (S11, L3, L11, L7/L12, L16, L33), три – ацетилированы (S5, S18 и L7), один метилтиолирован (S12), к одному добавляются дополнительные аминокислотные остатки (S6), а у одного удаляются С-концевые аминокислотные остатки (L31). Функциональная значимость модификаций рибосомных белков в настоящее время не известна, они не относятся к жизненно необходимым для клетки и, вероятно, выполняют регуляторную роль. В обзоре рассмотрены все известные посттрансляционные модификации рибосомных белков *E. coli*, а также некоторые ферменты, осуществляющие модификацию, и механизм их действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рибосомные белки, посттрансляционная модификация, *Escherichia coli*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РНК – рибонуклеиновая кислота; рРНК – рибосомная РНК; мРНК – матричная РНК; тРНК – транспортная РНК; IF2 – инициаторный фактор 2; EF-Tu – элонгационный фактор Tu; EF-G – элонгационный фактор G; RF3 – фактор терминации 3; GTP – гуанозин-5'-трифосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – сложная молекулярная машина, отвечающая за правильный перевод генетической информации с последовательности нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислот синтезируемого белка. Рибосома представляет собой комплекс рибосомных РНК (рРНК) и белков, который состоит из двух неравных частей (большой и малой субчастиц). Малая субчастица рибосом *Escherichia coli* состоит из 16S рРНК и 22 белков (обозначаемых S1–S22), а большая – из 5S и 23S рРНК и 34 различных белков (L1–L36). В клетке как рРНК, так и рибосомные белки подвергаются ферментативной модификации. Больше чем у половины рибосомных белков отщепляется N-концевой остаток метионина. Шесть белков метилированы (S11, L3, L11, L7/L12, L16, L33), три – ацетилированы (S5, S18 и L7), один метилтиолирован (S12), к одному добавляются дополнительные аминокислотные остатки (S6), а один подвергается частичному протеолизу (L31) (табл. 1). Природа некоторых модификаций рибосомных белков *E. coli* до сих пор не установлена [1].

Гены, которые кодируют ферменты, осуществляющие посттрансляционную модификацию, в большинстве случаев идентифицированы. Несмотря на это, функциональная роль этих модификаций практиче-

ски не изучена. Центральная роль рибосомы в механизме реализации генетической информации в клетке позволяет предположить, что модифицированные белки рибосомы могут быть важны для целого ряда механизмов регуляции экспрессии генов.

ПРОЦЕССИНГ N-КОНЦА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

Самый распространенный тип посттрансляционной модификации белков – удаление N-концевого остатка метионина, осуществляемое метионин-аминопептидазой (MAP). Концевой метионин отщепляется у 34 из 57 рибосомных белков *E. coli* (табл. 2).

Эта модификация наиболее часто встречается в белках, в которых следующий за метионином аминокислотный остаток имеет короткую боковую цепь [2]. Большие боковые цепи препятствуют попаданию белка в активный центр метионин-аминопептидазы. Если в молекуле белка второй остаток – аланин (21 случай), а также лейцин, пролин или глицин, то N-концевой метионин всегда отщепляется. Если же за первым остатком следуют лизин, изолейцин, глутамин, аргинин, аспарагиновая кислота, тирозин, глутаминовая кислота, фенилаланин или валин, как это наблюдается у 20 рибосомных белков, то N-концевой остаток метионина всегда сохраняется в молекуле

Таблица 1. Модификации рибосомных белков *E. coli*

Белок	Положение модификации	Модификация	Модифицирующий фермент
S5	N-концевая аминокислотная группа	Ацетилирование	RimJ
S6	C-конец	Добавление дополнительных остатков глутаминовой кислоты	RimK
S11	N-концевая аминокислотная группа	Метилирование, образование изопептидной связи	Не установлен
		Образование остатка изоаспартата	Не установлен
S12	Asp88	Метилтиолирование	RimO
S18	N-концевая аминокислотная группа	Ацетилирование	RimI
L3	Gln150	Метилирование	PrmB
L7/L12	Lys81	Метилирование	Не установлен
L11	Ala1, Lys3, Lys39	Метилирование	PrmA
L12	N-концевая аминокислотная группа	Ацетилирование	RimL
L16	N-концевая аминокислотная группа	Метилирование	Не установлен
L31	C-конец	Удаление аминокислотных остатков	Не установлен
L33	N-концевая аминокислотная группа	Метилирование	Не установлен

белка. Когда в положении 2 находится серин, в четырех случаях из пяти остаток метионина сохраняется. Следует отметить, что остатки метионина удаляются только из некоторой доли молекул белка L33, часть цепей (не более 25%) остается с N-концевым метилированным метионином. Вероятно, это связано с конкуренцией N-концевого метилирования и отщепления метионина [3].

ПРОЦЕССИНГ С-КОНЦА БЕЛКА L31

Определенная химическим путем С-концевая аминокислотная последовательность рибосомного белка L31 (...RFNPK) [4] отличается от предсказанной по нуклеотидной последовательности гена этого белка (...RFNKRFPNIPGSK). Был сделан вывод, что белок L31 подвергается С-концевому процессингу (возможно, существует специфическая протеаза, удаляющая фрагмент RFNIPGSK). В дальнейшем эти данные опровергли и показали, что первичная структура L31 согласуется с геномной [5]. Однако масс-спектрометрический анализ рибосомных белков выявляет два пика для L31: при 7871.1 Да, который соответствует полной последовательности L31, предсказанной по геномной, и при 6971.1 Да, соответствующий фрагменту L31 без С-концевого участка ...RFNIPGSK [1]. По-видимому, процессируется только часть молекул белка L31.

L31 – малоизученный компонент бактериальной рибосомы. Известно, что L31 образует рибонуклеопротеидный комплекс с белками L5, L18, L25 и 5S рРНК, он располагается на вершине центрального протуберанца в непосредственной близости к месту контакта субчастиц. Посттрансляционная модифи-

кация служит, возможно, для активации белка либо играет регуляторную роль. Однако данных о функции сайт-специфического протеолиза L31, как и о его возможном механизме, нет.

Интересно, что геном *E. coli* содержит два гена белка L31 со сходной, но не идентичной последовательностью [6]. Белок L31, присутствующий в клетках в «обычных» лабораторных условиях культивирования, содержит мотив «цинковая лента». При недостатке ионов цинка при помощи транскрипционного регулятора Zur активируется экспрессия другого варианта L31, лишенного «цинковой ленты». Это переключение, по-видимому, способствует более экономному использованию ионов цинка в клетке. Аналогичный механизм описан для рибосомного белка L36 [7].

МЕТИЛИРОВАНИЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

Метилирование – один из наиболее распространенных типов посттрансляционной модификации белков, которому подвергаются самые разные прокариотические и эукариотические белки. Метилирование осуществляется специальными ферментами (метилтрансферазами), которые используют S-аденозилметионин в качестве донора метильных групп. Выделяют пять классов метилтрансфераз, отличающихся структурой и субстратной специфичностью.

Как правило, метилирование рибосомных белков происходит по боковой аминокислотной группе лизина или аргинина, часто встречается и метилирование N-концевой аминокислотной группы. В клетках *E. coli* метилированы шесть рибосомных белков (табл. 1) [8]. Идентифицированы

Таблица 2. Посттрансляционное удаление N-концевого остатка метионина в рибосомных белках *E. coli* [1]

Белок	Удаление Met	Второй остаток после Met
S1	?	Thr
S2	+	Ala
S3	+	Gly
S4	+	Ala
S5	+	Ala
S6	-	Arg
S7	+	Pro
S8	+	Ser
S9	+	Ala
S10	-	Gln
S11	+	Ala
S12	+	Ala
S13	+	Ala
S14	+	Ala
S15	+	Ser
S16	-	Val
S17	+	Thr
S18	+	Ala
S19	+	Pro
S20	+	Ala
S21	+	Pro
S22	-	Lys
L1	+	Ala
L2	+	Ala
L3	-	Ile
L4	-	Glu
L5	+	Ala
L6	+	Ser
L7	+	Ser
L9	-	Gln
L10	+	Ala
L11	+	Ala
L12	+	Ser
L13	-	Lys
L14	-	Ile
L15	-	Arg
L16	-	Leu
L17	-	Arg
L18	-	Asp
L19	-	Ser
L20	+	Ala
L21	-	Tyr
L22	-	Glu
L23	-	Ile
L24	+	Ala
L25	-	Phe
L26	+	Ala
L27	+	Ala
L28	+	Ser
L29	-	Lys
L30	+	Ala
L31	-	Lys
L32	+	Ala
L33	+	Ala
L34	-	Lys
L35	+	Pro
L36	-	Lys

специфичные для двух белков (L11 и L3) метилтрансферазы (PrmA и PrmB соответственно), найдены кодирующие их гены. Об остальных модификациях известно очень немного.

Некоторые метилированные рибосомные белки играют важную роль в функционировании рибосомы: L7/L12 и L11 взаимодействуют с факторами трансляции, L3 участвует в сборке рибосомы. Однако, несмотря на то что функции этих рибосомных белков достаточно хорошо изучены, биологическое значение их метилирования до сих пор не выяснено. Мутации в генах, кодирующих соответствующие метилтрансферазы, не приводят к заметным фенотипическим изменениям. Вероятно, метилирование регулирует внутри- и межмолекулярные взаимодействия в белке или влияет на его сродство к РНК и таким образом действует на различные клеточные процессы – регуляцию трансляции, ее точность, процессинг РНК и сборку рибосомы.

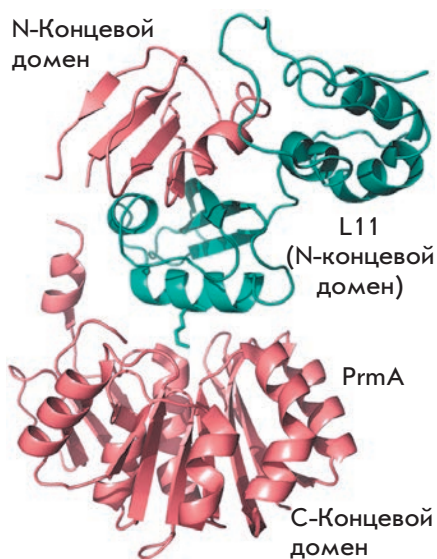
Метилирование белка L11

Наиболее сильно метилированный белок бактериального аппарата трансляции – рибосомный белок L11 [9]. Он содержит три метилированных аминокислотных остатка: N-концевой остаток аланина триметилирован по α -аминогруппе, 3-й и 39-й остатки лизина триметилированы по ϵ -аминогруппам. Таким образом, всего к белку посттрансляционно присоединяются девять метильных групп [10]. Метилирование осуществляет один фермент – PrmA (protein modification), который был выделен и охарактеризован [11]. Установлено, что это белок массой 31 кДа, использующий в качестве донора метильной группы S-аденозилметионин и преимущественно модифицирующий свободный белок L11. Последнее указывает на то, что метилирование предшествует встраиванию белка в рибосому [11].

Получен мутантный штамм *E. coli*, не содержащий метильных групп в белке L11. С помощью этого штамма определено положение гена *prmA*, кодирующего метилтрансферазу PrmA [12].

Этот фермент обладает необычной субстратной специфичностью, что позволяет ему модифицировать несколько аминокислотных групп белка, принадлежащих разным аминокислотным остаткам и расположенным различным образом по отношению к пептидному скелету (α - и ϵ -аминогруппы). Для этого фермент должен либо связываться с субстратом в нескольких разных ориентациях, либо для множественной модификации использовать систему гибкого субстратного позиционирования, позволяющую переориентировать субстрат относительно постоянного участка связывания. Строение PrmA и механизм его взаимодействия с субстратом подробно изучен [13, 14].

Рис. 1. Структура PrmA в комплексе с N-концевым доменом L11. PrmA и L11 показаны розовым и голубым. Боковая цепь остатка Lys39 показана в каркасном виде [13].



Метилтрансфераза PrmA состоит из двух доменов, соединенных гибким линкером (рис. 1). Большой каталитический С-концевой домен является типичным примером метилтрансфераз класса I. Семитяжевой β -лист фланкирован с обеих сторон α -спиралями. Небольшой дополнительный трехтяжевой β -лист служит связующим звеном между С-концевым доменом и линкерной междоменной α -спиралью. Маленький N-концевой домен состоит из четырехтяжевого β -листа, фланкированного с одной стороны междоменной линкерной α -спиралью, с другой – N-концевой α -спиралью. N-Концевой домен PrmA уникален, он способен распознавать и связывать белок L11 (рис. 1) [13]. С помощью биоинформатических методов установлено, что N-концевой домен PrmA по структуре напоминает V-домен фактора EF-G, который при связывании с рибосомой находится в непосредственной близости к белку L11 [15].

Поверхность связывания N-концевого домена PrmA с белком L11 частично перекрывается с поверхностью связывания L11 с 23S рРНК. Поэтому PrmA модифицирует L11 только в свободном состоянии, до его встраивания в рибосому. Это подтверждает ранее полученные данные метилирования L11 *in vitro* [11]. Связывание N-концевого домена PrmA с L11 высокоспецифично, стабилизировано множеством водородных связей, тогда как каталитический С-концевой домен сам по себе не обладает специфичностью, его взаимодействие с субстратом стабилизировано лишь локальным гидрофобным взаимодействием (боковая цепь модифицируемого остатка лизина попадает в активный центр через туннель, образованный гидрофобными аминокислотными остатками, которые взаимодействуют с гидрофобной частью бокового радикала лизина). За счет гибкости

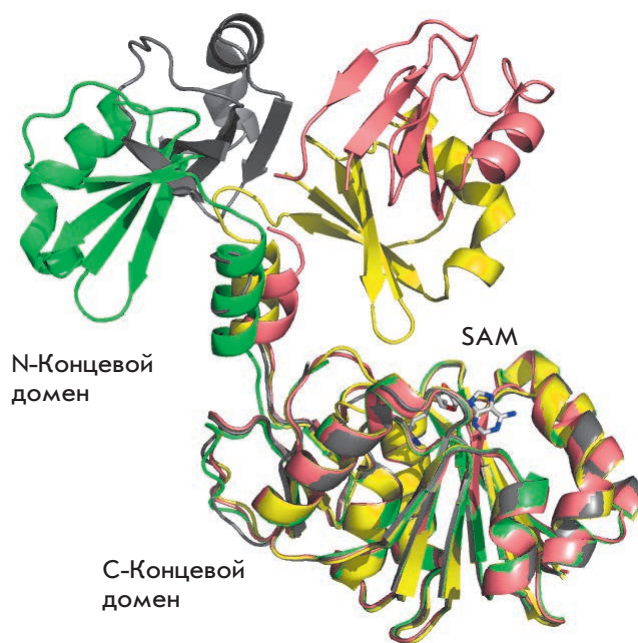


Рис. 2. Наложение структур PrmA в четырех различных конформациях. Зеленым и серым показаны две конформации PrmA в свободном состоянии, желтым – комплекс PrmA и SAM, розовым – в комплексе с L11. Видна высокая подвижность N-концевого домена [13].

междоменного линкера каталитический домен может изменять свое положение относительно связанного с L11 N-концевого домена и метилировать все доступные для него аминокислотные группы (рис. 2).

В структуре каталитического домена имеется специальный гидрофобный карман для связывания S-аденозилметионина, этот карман открыт, т.е. возможен обмен между S-аденозилгомоцистеином (продуктом реакции) и S-аденозилметионином без нарушения фермент-субстратного комплекса. В активном центре PrmA нет атомов, затрудняющих вращение метилированной аминокислотной группы, что позволяет однажды связавшемуся с субстратом ферменту сразу три метилировать его. Для метилирования аминокислотной группы необходимо, чтобы каталитический центр содержал основной аминокислотный остаток, акцептирующий протон с атома азота. Роль такого остатка, очевидно, выполняет His104, находящийся в активном центре напротив участка связывания кофактора.

Таким образом, метилирование, осуществляемое ферментом PrmA, служит редким примером одновременного специфического узнавания мишени и множественной модификации субстрата за счет разделения в пространстве участка связывания и каталитического центра, а также их взаимной подвижности. Одна молекула метилтрансферазы способна последовательно ввести девять метильных групп

в белок L11 без диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Белок L11 – это консервативный компонент большой субчастицы бактериальной рибосомы и активный участник взаимодействия рибосомы с факторами инициации, элонгации и терминации трансляции. Он состоит из двух доменов, соединенных между собой гибким линкером: С-концевого, связывающего 23S рРНК, и N-концевого, взаимодействующего с факторами трансляции [13]. N-Концевой домен является мишенью антибиотика тиострептона, который ингибирует связывание EF-G с рибосомой (устойчивость к тиострептону обеспечивается рядом мутаций в N-концевом домене белка L11) [16]. Методом криоэлектронной микроскопии показано, что N-концевой домен L11 прямо контактирует с факторами EF-G [15] и EF-Tu [17].

Все аминокислотные остатки, которые триметилируются PrmA, находятся в N-концевом домене. Такое расположение модифицированных остатков рядом с местом контакта с факторами трансляции может указывать на функциональную значимость метилирования. Структура PrmA консервативна у всех бактерий, что также может свидетельствовать о его вкладе в функционирование L11. Но, тем не менее, функция модификации, осуществляемой PrmA, до сих пор не установлена. Штамм с мутацией гена *prmA* не только жизнеспособен, но и не имеет никаких заметных отличий от штамма дикого типа (одинаковая скорость роста и одинаковое поведение в стрессовых условиях) [18, 19]. Это означает, что множественное метилирование L11 не является необходимым для нормального функционирования рибосомы. В то же время оно может влиять на скорость и точность таких этапов работы рибосомы, как декодирование и транслокация, что можно зафиксировать только с применением очень точного кинетического анализа *in vitro* либо введением специфических мутаций в белок L11 или другие компоненты аппарата трансляции *in vivo* [13].

Метилирование белка L3

К рибосомному белку L3 посттрансляционно добавляется одна метильная группа [20]. Метилирование происходит по амидной группе 150-го остатка глутамина [21]. Модификацию осуществляет специфическая метилтрансфераза PrmB, ген которой идентифицирован [12]. PrmB – первая описанная метилтрансфераза, мишенью которой служит амидный атом азота.

У штамма, содержащего мутацию в гене *prmB*, отсутствие метилирования в белке L3 сочетается с чувствительностью к холоду. Скорость роста мутантных клеток при 22°C значительно ниже, чем у клеток дикого типа [22, 23]. Это связано с тем, что при низкой

температуре сборка рибосом в мутантных клетках происходит неэффективно, а по структуре и стабильности образующиеся промежуточные рибонуклеопротеидные комплексы отличаются от соответствующих интермедиатов в штамме дикого типа. Тем не менее, полностью сформированные при пониженной температуре мутантные рибосомы не отличаются по стабильности от рибосом дикого типа. Разницы в скорости трансляции и ее точности также не наблюдается ни *in vivo*, ни *in vitro* [22].

Изучение активности фермента PrmB *in vitro* показало, что белок L3 в свободном состоянии не метилируется. Полностью собранную рибосому метилтрансфераза также не модифицирует. Наибольшая активность наблюдается в частично собранной рибосоме, а также в присутствии в реакционной смеси рРНК (любой, не обязательно рибосомной) [22].

Белок L3 связывается с 3'-концевым участком 23S рРНК на самом первом этапе сворачивания структуры и является, наряду с L24, инициатором всего процесса сборки рибосомы [24].

Из сказанного можно сделать вывод, что *in vivo* PrmB осуществляет метилирование L3, связываясь с рибосомой на одном из промежуточных этапов ее сворачивания, и, вероятно, оказывает определенное влияние на правильность ее упаковки. Таким образом, фермент PrmB можно отнести к факторам сборки рибосомы.

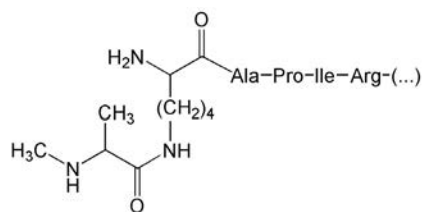
Белок L3 имеет глобулярный домен, располагающийся на поверхности рибосомы, и длинный глубоко погруженный внутрь отросток. Модифицированный 150-й остаток глутамина располагается внутри рибосомы рядом с туннелем для растущей полипептидной цепи, он образует контакты с нуклеотидными остатками G2032, C2055 и A2572, которые находятся в 3'-концевой области 23S рРНК. Очевидно, этот остаток вносит вклад в формирование и поддержание правильной конформации рРНК.

Метилирование белка S11 и образование изомерной пептидной связи

В рибосомном белке S11 метилированию подвергается N-концевая аминокислотная группа, принадлежащая остатку аланина. Помимо метилирования наблюдается образование изопептидной связи. Этой модификации подвержен только один белок *E. coli*, S11. При этом разрушается пептидная связь между первым и вторым остатками (аланин и лизин) в молекуле S11 (рис. 3) [25].

В работе [26] сообщается, что в белке S11 обнаружен остаток изоаспартата. На один моль белка приходится 0.5 моль изоаспартата. При этом показано, что в логарифмической фазе роста такую модификацию имеет только S11.

Рис. 3. Структура метилированного N-концевого остатка S11, образующего изопептидную связь [25].



Ферменты, осуществляющие перечисленные модификации, не установлены, как и функциональная роль модификаций.

Белок S11 находится в непосредственной близости к мРНК и тРНК в E-участке. Его N-конец, выступающий на поверхность рибосомы, не виден в кристаллической структуре и, вероятно, не имеет фиксированной ориентации. Маловероятно, что модифицированный остаток вносит вклад в поддержание структуры рибосомы. Возможно, метилированный N-конец S11 взаимодействует с тРНК и облегчает ее выход из E-участка.

Метилирование белка L7/L12

Рибосомный белок L7/L12 монометилирован по ϵ -аминогруппе 81-го остатка лизина. Степень метилирования сильно зависит от температуры. При 37°C модификации практически не наблюдается (меньше 0.1 метильной группы на молекулу белка). С понижением температуры количество вводимых групп резко увеличивается и при 27°C составляет 0.6 остатка монометиллизина на молекулу белка [27]. Фермент, осуществляющий эту модификацию, не установлен.

В составе рибосомы белок L7/L12 находится в виде тетрамера, представляющего собой палочковидный отросток, так называемый «L7/L12-стержень». Каждая цепь в тетрамере состоит из двух доменов: N-концевого, связывающегося с белком L10, и C-концевого. Домены соединены гибким линкером, позволяющим C-концевым доменам свободно изменять свое положение относительно большой субчастицы. Таким образом, L7/L12 – единственный рибосомный белок, не контактирующий непосредственно с рРНК, он связан с ней через комплекс с белком L10. Этот комплекс выполняет важную роль в процессе трансляции, он участвует в связывании с рибосомой факторов трансляции (IF2, EF-Tu, EF-G и RF3) [28]. Метилированные остатки располагаются в C-концевом домене и, возможно, вносят свой вклад во взаимодействие с факторами трансляции.

Метилирование белков L16 и L33

В рибосомных белках L16 и L33 метилированию подвергаются N-концевые аминокислоты. В L16 моди-

фицирован первый остаток метионина [29]. А в L33 часть полипептидных цепей начинается с монометилированного метионина (не более 25%), а часть – с монометилированного аланина [30]. Подобная гетерогенность, по-видимому, связана с конкуренцией процессов метилирования и отщепления N-концевого метионина. Предположение о возможном восстановлении N-формилметионина до N-метилметионина было опровергнуто [3].

Метилтрансферазы, осуществляющие модификацию белков L16 и L33, не идентифицированы.

В белке L16 обнаружен еще один вид модификации. Исходя из аминокислотной последовательности, белок L16 должен иметь массу 15281.3 Да. Однако на масс-спектре этого белка нет пика, соответствующего такой массе, но есть пик для массы 15326.2 Да, что на 44.9 Да больше. Метильная группа на N-конце белка увеличивает его массу только на 14 Да. Это означает, что молекула L16 должна содержать, как минимум, еще одну посттрансляционную модификацию. Предположительно, Arg81 подвергается гидроксигидроксилированию, но и в этом случае модифицированный белок должен быть на 14.9 Да легче наблюдаемого масс-спектрометрически [1]. Возможно, имеет место еще одно метилирование или гидроксигидроксилирование. Более определенные данные о природе и локализации неизвестной модификации будут получены из масс-спектров продуктов трипсинолиза белка L16.

Белки L16 и L33 располагаются рядом с центральным протуберанцем с противоположных сторон. Их N-концевые остатки выходят на поверхность рибосомы и не образуют прямых контактов с рРНК и белками.

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

N^α-ацетилирование белков катализируется N^α-ацетилтрансферазами, которые переносят ацетильную группу с ацетилкофермента А на N-концевую аминокислотную группу белка. У эукариот такая модификация белков встречается повсеместно – 80–90% цитоплазматических белков у млекопитающих и 50% у дрожжей ацетилированы по N-концевому аминокислотному остатку [31]. У прокариот такая модификация осуществляется редко. Известно всего четыре белка *E. coli*, которые ей подвергаются: фактор EF-Tu, а также рибосомные белки S5, S18 и L7. Определены гены, кодирующие ферменты, которые осуществляют модификацию рибосомных белков S5, S18 и L7: *rimJ*, *rimI* и *rimL* соответственно. Каждая из перечисленных ацетилтрансфераз специфически модифицирует только один белок (в отличие от эукариот, у которых такие ферменты менее специфичны). Несмотря на сходные функции, структуры этих ферментов сильно различаются. Сходство

последовательностей RimI (148 остатков), RimJ (194 остатка) и RimL (178 остатков) составляет 19 и 20% соответственно, а между RimJ и RimL – 23% (хотя RimI и RimJ – аланин-ацетилтрансферазы, а RimL – серин-ацетилтрансфераза). Вероятно, эти белки не имели общего предка и эволюционировали независимо друг от друга [32].

Эукариотические N^α-ацетилтрансферазы, как правило, состоят из двух или трех различных субъединиц, они модифицируют субстрат котрансляционно, тогда как прокариотические ферменты чаще мономерны или представляют собой гомодимеры (например, RimL) и ацетируют субстрат посттрансляционно [33].

Ацетилирование белка S5

Рибосомный белок S5 ацетилирован по α-аминогруппе первого остатка аланина [34]. Ацетилирование осуществляется специфическим ферментом RimJ (ribosomal modification) [35]. Идентифицирован и секвенирован ген *rimJ*, кодирующий этот фермент [36].

Установлена субстратная специфичность RimJ. В работе [37] авторы исследовали штамм *E. coli*, содержащий мутацию в центральном псевдоузле 16S рРНК (С18А). Эта мутация приводит к нарушению сборки 30S субчастицы, ухудшению связывания с ней белков S1, S2, S18 и S21 и, следовательно, к снижению эффективности трансляции. Помимо этого, мутация вызывает уменьшение доли ацетилированных молекул S5, т.е. снижается активность RimJ. Это, очевидно, связано с тем, что S5 находится в непосредственной близости к центральному псевдоузлу, мутации в котором могут изменять место посадки S5 на 30S субчастицу, тогда RimJ не может связываться с субстратом. Стоит отметить, что в собранных 70S мутантных рибосомах неацетилированный S5 не найден. Видимо, связывание мутантной 30S субчастицы с 50S стабилизирует функционально активную конформацию 30S субчастицы. Находясь в этой конформации, 30S субчастица становится субстратом RimJ. Ранее было показано, что мутация в белке S4 также приводит к меньшей эффективности ацетилирования S5 [38]. Эти данные свидетельствуют о том, что ацетилирование S5 осуществляется на собранной рибосоме.

Функция RimJ связана не только с модификацией белка S5, но и с другими этапами биогенеза малой субчастицы рибосомы [39]. В штамме *E. coli* с мутацией в гене белка S5 (28-й остаток глицина заменен на аспарагиновую кислоту) нарушена сборка рибосом и снижена точность трансляции, наблюдается чувствительность к холоду. Суперэкспрессия RimJ в этом штамме полностью восстанавливает все дефекты трансляции. Это означает, что независимо от ацетилтрансфераз-

ной активности RimJ вносит вклад в формирование правильной структуры рибосомы. Доказательством может служить то, что RimJ связывается с 30S субчастицей на ранних стадиях ее сборки [39]. Функции RimJ как фактора сборки рибосомы и ацетилтрансферазы могут совмещаться и осуществляться одновременно или последовательно.

Белок S5 располагается на противоположной по отношению к декодирующему центру стороне малой субчастицы. N-Концевые остатки выступают над поверхностью рибосомы и не видны в кристаллической структуре. Значит, α-аминогруппа первого остатка белка S5 в составе рибосомы доступна для ацетилирования, что согласуется с результатами работы [37].

Белок RimJ выполняет функции, не связанные напрямую с ацетилированием S5. Показано, что RimJ является репрессором оперона *pap*, отвечающего за биосинтез пилей в патогенном штамме *E. coli*, вызывающем пиелонефрит. RimJ регулирует транскрипцию этого оперона в зависимости от внешних условий (температура, наличие питательных веществ). Механизм этой регуляции и ее связь с ацетилтрансферазной функцией RimJ не установлены [40].

Ацетилирование белка S18

Белок S18, как и S5 и L12, подвергается N-концевому ацетилированию (по остатку аланина) [41]. Модификация осуществляется специфической ацетилтрансферазой, кодируемой геном *rimI* [36].

Ацетилирование S18 не относится к модификациям, необходимым для клетки. Клетки с мутациями в гене *rimI* не только жизнеспособны, но и не отличаются фенотипически от клеток дикого типа [42].

Определена пространственная структура RimI из *Salmonella typhimurium* (первичная структура полностью идентична RimI из *E. coli*) [32]. Фермент имеет смешанную αβ-структуру с центральным семитяжковым β-листом, фланкированным четырьмя α-спиралями (рис. 4). Центральный β-лист имеет преимущественно антипараллельную структуру, за исключением параллельных тяжей 4 и 5. Порядок β-тяжей в листе линейный, кроме тяжа β7, расположенного между β5 и β6. Лист имеет V-образную структуру, в которой тяжи β1–β4 формируют одно плечо, а β5–β7 – другое. Предполагается, что в V-образном расширении между β4- и β5-тяжами располагается ацетилтрансферазный центр.

Исходя из данных о пространственной структуре комплекса фермента с субстратом и коферментом (ацетилкоферментом А), предложен механизм ацетилтрансферазной реакции (рис. 5).

N-Концевой атом азота S18 нуклеофильно атакует карбонильный атом углерода ацетилкофермента А,

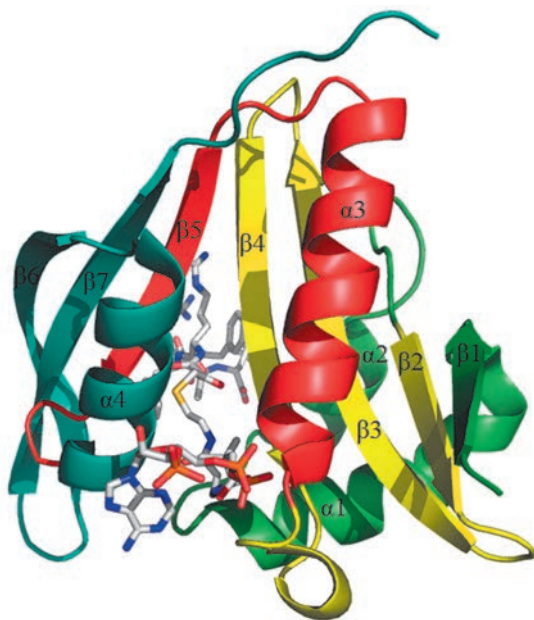


Рис. 4. Структура комплекса RimI-бисубстрат. Бисубстрат показан в каркасном виде. Элементы вторичной структуры окрашены зеленым ($\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$), желтым ($\beta 2$ – $\beta 4$), красным ($\alpha 3$, $\beta 5$) и синим ($\alpha 4$, $\beta 6$, $\beta 7$) в порядке их следования с N-конца [32].

остаток Glu103 выступает здесь как акцептор протона (рис. 5а). Это приводит к образованию тетраэдрического интермедиата (рис. 5б). При распаде интермедиата Tyr115 служит донором протона (рис. 5в).

Несмотря на то что установлен механизм ацетилирования S18, до сих пор не выяснено, в чем состоит функция ацетилирования, и когда оно происходит. Белок S18 располагается в центральном домене малой субчастицы рибосомы рядом с белками S11 и S6,

причем взаимодействие S18 с S6 настолько прочное, что образуется стабильный гетеродимер [43]. S18 находится вблизи E-участка. Первые 15 N-концевых остатков S18 не видны в кристаллической структуре рибосомы, а значит, скорее всего, не имеют фиксированного положения в пространстве. Возможно, они располагаются рядом с участком посадки мРНК на малую субчастицу. В этом случае N-концевое ацетилирование может влиять на процесс инициации трансляции.

Ацетилирование белка L12

Рибосомный белок L12 существует в двух различных формах: неацетилированной (L12) и ацетилированной (называемой L7) [44]. Из-за идентичности аминокислотных последовательностей этот белок называют L7/L12.

Ацетилирование α -атома азота Ser1 в белке L12 осуществляется специфическим ферментом RimL и приводит к образованию L7 [45]. RimL может ацетилировать *in vitro* как свободный белок L12 [46], так и L12 в составе рибосомы [33]. По-видимому, *in vivo* модификация L12 тоже может происходить на любом этапе биогенеза рибосомы. В отличие от полностью модифицированных S5 и S18, L12 ацетилирован лишь частично. Соотношение L7/L12 варьирует в зависимости от фазы и скорости роста клеток. В середине логарифмической фазы доля L12 достигает 85%, затем содержание L7 постепенно увеличивается до 75–80% в стационарной фазе [47]. При росте клеток в минимальной среде белок целиком переходит в форму L7.

Показано, что модификация L12 повышает прочность комплекса тетрамера L7/L12 с белком L10 [48]. Авторы объясняют это тем, что ацетилирование стабилизирует N-концевые α -спирали L7 (на рис. 6 обозначены $\alpha 1$), фиксируя положение N-концевого

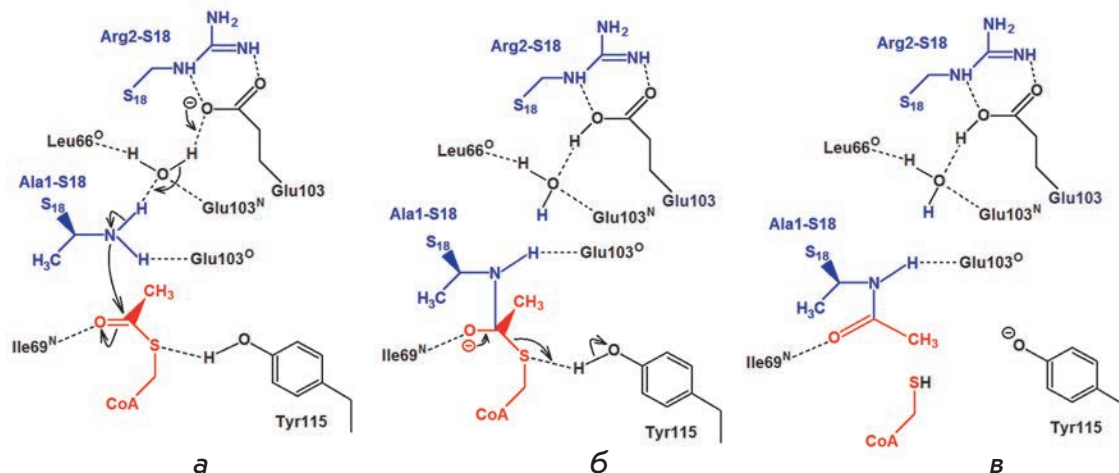


Рис. 5. Предполагаемый механизм реакции, катализируемой ферментом RimI. а – нуклеофильная атака карбонильного атома ацетилкофермента А; б – образование тетраэдрического интермедиата; в – комплекс RimI с продуктами [32].

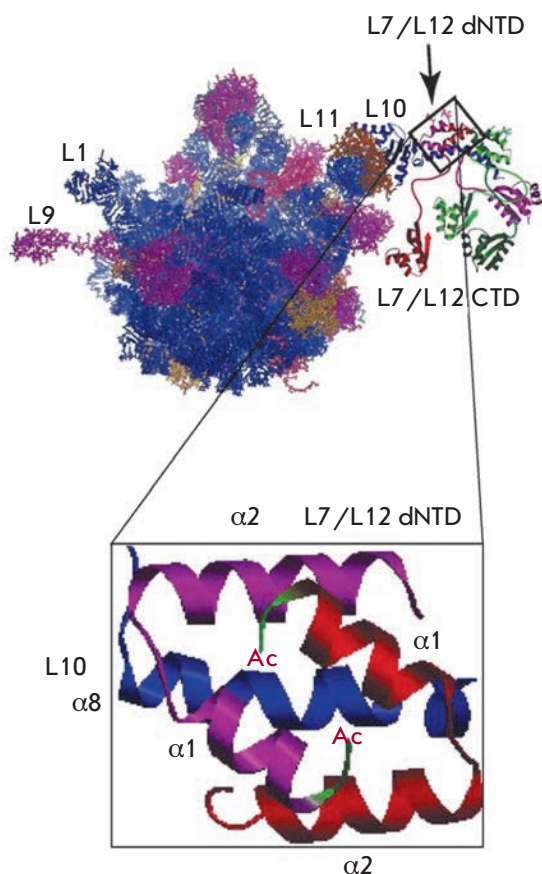


Рис. 6. Гипотетическая модель рибосомы *E. coli* с входящим в ее состав комплексом L7/L12 и L10. L10 показан синим, димеры L7/L12 – красным/фиолетовым и оттенками зеленого. Более детальное изображение взаимодействия димера N-концевых доменов L7/L12 со спиралью $\alpha 8$ белка L10 иллюстрирует гипотезу о том, что N-концевое ацетилирование приводит к более сильному связыванию N-концевого домена L7/L12 с белком L10 [48].

остатка в пространстве и компактизуя тем самым структуру, делает ее более прочной.

Тем не менее, штамм с мутацией в гене *rimL*, в котором весь белок L12 находится в деацетилированной форме, не имеет никаких заметных фенотипических отличий от штамма дикого типа. В частности, нет разницы в скорости роста клеток при 25, 37 и 42°C [46]. Значит, модификация не важна для функционирования рибосомы, а вопрос о ее возможной функции до сих пор остается открытым.

Субстратная специфичность RimL и природа N-концевого аминокислотного остатка субстрата изучена в работе [33]. Согласно опубликованным данным, в N^α-ацетилированных белках это, как правило, серин, аланин или метионин. Например, в L12

из *E. coli* это серин, в L12 из *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis* – аланин, как и в S18 и S5 *E. coli*. Предположение об отсутствии у RimL специфичности к N-концевому остатку было подтверждено экспериментально. RimL эффективно ацетилюет *in vitro* мутантный L12, в котором Ser1 заменен на Ala1 [33].

В случае эукариотических N^α-ацетилтрансфераз второй аминокислотный остаток N^α-ацетилируемого белка влияет на модификацию первого. Если второй остаток – аспартат или глутамат, то модификация происходит эффективно. Чтобы исследовать влияние второго аминокислотного остатка на активность RimL, получили мутантный L12, в котором Ile2 заменили на Asp2. Оказалось, что RimL ацетилюет такой мутантный белок гораздо менее эффективно, чем нативный L12. Это еще раз подчеркивает отличие прокариотических N^α-ацетилтрансфераз от эукариотических [33].

Получена кристаллическая структура RimL из *Salmonella typhimurium* (сходство первичной структуры с RimL из *E. coli* составляет 83%). RimL представляет собой гомодимер, способный связать две молекулы ацетилкофермента А и модифицировать димерный L12 [49].

МЕТИЛТИОЛИРОВАНИЕ БЕЛКА S12

Первичную структуру рибосомного белка S12 *E. coli* определили химическим путем, однако его 88-й аминокислотный остаток установить не удалось [50]. Последующее секвенирование гена, кодирующего S12, показало, что в этой позиции находится аспарагиновая кислота [51]. И только через 20 лет, используя масс-спектрометрический анализ, показали, что молекулярная масса S12 равна 13652 Да (на 46.1 Да больше, чем предсказано по нуклеотидной последовательности) [1]. Дальнейшее изучение этого феномена показало, что такое несоответствие обусловлено наличием метилтиоэфирной группы (-SCH₃) (рис. 7) у β-атома углерода Asp88 [52]. Еще позднее нашли ген *rimO*, который кодирует метилтиотрансферазу, осуществляющую данную посттрансляционную модификацию [53].

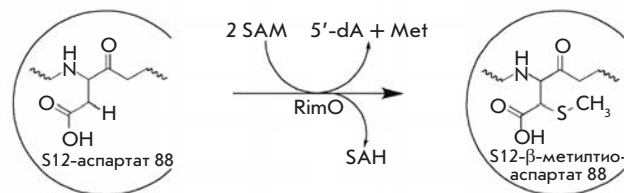


Рис. 7. Реакция, катализируемая RimO. Метилтиолирование остатка Asp88 белка S12.

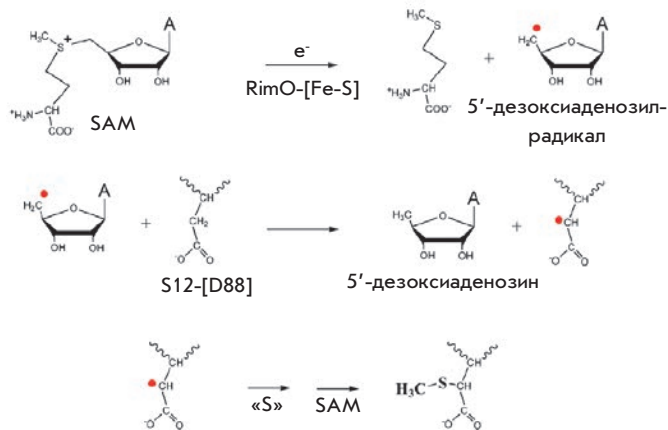


Рис. 8. Механизм реакции, катализируемой RimO [55].

Эта реакция – пример достаточно редкого в природе ферментативного образования связи C–S из C–H. Такие реакции осуществляются по радикальному механизму с использованием S-аденозилметионина в качестве кофермента [54].

S12 – консервативный элемент рибосомы, а остаток Asp88 найден у всех известных гомологов S12 – в бактериях, археях и эукариотах (хотя модификация наблюдается не всегда). Asp88 располагается рядом с функциональным центром рибосомы. Попытки получить клетки *E. coli* с мутацией по этой аминокислоте не дали положительного результата. Все это указывает на важность Asp88 для функционирования рибосомы.

Все известные до RimO метилтиотрансферазы посттранскрипционно модифицируют РНК, RimO – первый изученный фермент этого семейства, мишенью которого служит белок. В *E. coli* помимо RimO обнаружена только одна метилтиотрансфераза, MiaB, модифицирующая тРНК. Аминокислотные последовательности этих двух белков характеризуются сильным сходством [53]. В частности, обе содержат мотив SxxxSxxC, канонический для всего семейства метилтиотрансфераз.

Метилтиолирование белка S12 осуществляется по радикальному механизму (рис. 8). На первом этапе разрывается связь C–S в S-аденозилметионине с образованием свободного метионина и 5'-дезоксаденозил-радикала. Затем этот радикал отнимает атом водорода у β-атома углерода Asp88. После этого образуется тиоэфир, который на последней стадии метилируется. Таким образом, для модификации одной молекулы белка S12 требуются две молекулы S-аденозилметионина [55].

Метилирование на последней стадии также происходит с помощью фермента RimO. Это значит,

что RimO является метилтрансферазой, хотя консервативные S-аденозилметионинсвязывающие мотивы, характерные для ферментов этого семейства, в нем не найдены [56].

Спектроскопически установлено, что в состав RimO входят два кластера [4Fe-4S] (рис. 9). Первый координирован остатками Cys150, Cys154 и Cys157 (консервативный SxxxSxxC-мотив), второй – остатками Cys17, Cys53 и Cys82. Предполагается, что первый кластер участвует в образовании 5'-дезоксаденозил-радикала, а второй служит источником атома серы для образования тиоэфира [56].

RimO содержит так называемый TRAM-домен, который у MiaB служит для связывания РНК [53]. Это может указывать на то, что RimO модифицирует белок S12 в составе рибосомы. Действительно, экспериментально подтверждено, что *in vivo* RimO метилтиолирует остаток Asp88 белка S12, который входит в состав малой субчастицы [57]. Ранее было установлено, что *in vitro* рекомбинантный RimO из *E. coli* и *Thermatoga maritima* может модифицировать синтетический пептидный субстрат, который имитирует петлю, содержащую остаток Asp88, но с очень низкой эффективностью [58].

Недавно показали, что в модификации белка S12 принимает участие не только RimO, но и консервативный белок YcaO, функция которого ранее не была известна. Нокаут гена *ycaO* приводит к практически полному подавлению метилтиолирующей активности RimO. Кроме того, транскриптомный анализ штаммов с делецией генов *rimO* и *ycaO* указывает на перекрывание транскрипционных фенотипов, что говорит о функциональном родстве RimO и YcaO. Белок YcaO связывается с малой субчастицей и, возможно, выполняет функцию шаперона, облегчая образование фермент-субстратного комплекса [57].

Следует упомянуть, что после метилтиолирования остатка аспарагиновой кислоты появляется новый хиральный центр (β-атом углерода), но его конфигурация до сих пор не установлена.

Белок S12 состоит из глобулярного домена, расположенного рядом с А-участком в декодирующем

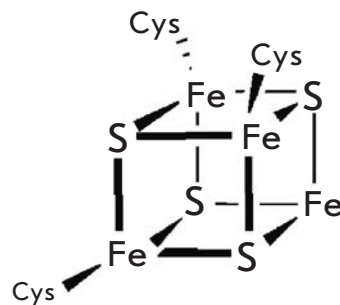


Рис. 9. Кластер [4Fe-4S], координированный остатками цистеина, в структуре RimO [56].

центре, и длинного стержнеобразного отростка, который закрепляет белок на малой субчастице. S12 – единственный белок, находящийся на поверхности соприкосновения большой и малой субчастиц. Модифицированный остаток располагается вблизи декодирующего центра, но не образует прямых контактов ни с мРНК, ни с тРНК. Он погружен в карман, образованный двумя петлями: первая формируется из нуклеотидов 522–528 16S рРНК, вторая – из аминокислотных остатков 44–51 самого S12.

Функция модификации S12 до сих пор не выяснена. Известно, что мутации в соседних остатках (Lys87, Leu89, Pro90, Gly91 и Arg93) приводят к появлению устойчивости к стрептомицину или зависимости от него [53]. Также известно, что белок S12 принимает участие в самопроизвольной транслокации рибосомы (не зависящей от EF-G и GTP), а мутация в соседнем 87-м аминокислотном остатке нарушает эту функцию [59]. Тем не менее, в случае мутации в гене *rimO* упомянутые фенотипические изменения отсутствуют. Единственное отличие такого мутанта от штамма дикого типа – немного сниженная скорость роста [53].

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКА S6

Рибосомный белок S6 имеет уникальную разновидность посттрансляционной модификации. На его С-конце располагаются от двух до шести остатков глутаминовой кислоты (...ADDAEAGDSEE(E)₀₋₄) [60, 61]. Из них в гене (*rpsF*) закодированы только первые два (...ADDAEAGDSEE) [62], остальные добавляются посттрансляционно. Модификация происходит ступенчато, остатки глутаминовой кислоты добавляются по одной [63].

Получен мутантный штамм, в котором не наблюдается гетерогенности С-конца белка S6 и содержатся только два остатка глутаминовой кислоты. С помо-

щью этого штамма обнаружен ген *rimK*, отвечающий за эту модификацию [64]. Этот ген кодирует фермент с молекулярной массой 31.5 кДа, который узнает белок S6 и добавляет дополнительные остатки на его С-конец. В случае мутации в гене *rpsF*, приводящей к замене предпоследнего остатка глутаминовой кислоты на лизин, посттрансляционной модификации белка S6 не наблюдается [64]. Это означает, что RimK узнает С-концевой участок белка S6 дикого типа. В некоторых мутантных штаммах RimK добавляет к S6 больше четырех остатков глутаминовой кислоты, однако причины этого не выяснены [65].

Установлено, что в условиях, когда не происходит сборка рибосомы (в облученных ультрафиолетом клетках), S6 не подвергается модификации [66]. Биоинформатическими методами в RimK найден РНК-связывающий мотив [67]. Эти данные могут указывать на то, что модификация происходит во время или после встраивания белка S6 в рибосому.

Белок S6 располагается в центральном домене малой субчастицы рибосомы. Взаимодействуя с белками S18, S8 и S15, он предохраняет 16S рРНК от атаки эндонуклеаз. С-Концевые аминокислотные остатки S6 выступают наружу и не видны в кристаллической структуре.

S6 – самый кислый белок 30S субчастицы (pI = 4.8), а наблюдаемая посттрансляционная модификация делает его кислотность еще более высокой. Функция этой модификации не выяснена, однако это первый известный случай посттрансляционного добавления аминокислотных остатков. ●

*Работа поддержана Российским фондом
фундаментальных исследований (грант 10-04-
01345-а), Федеральной программой «Кадры»
НК29П П800, грантом HFSP RGY 0088/2008,
Программой Московского университета ПНР 5.13.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnold R.J., Reilly J.P. // *Anal. Biochem.* 1999. V. 269. P. 105–112.
2. Ben-Bassat A., Bauer K., Chang S.Y., Myambo K., Boosman A., Chang S. // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 751–757.
3. Chang F.N., Budzilowicz C. // *J. Bacteriol.* 1977. V. 131. P. 105–110.
4. Brosius J. // *Biochemistry.* 1977. V. 17. P. 501–508.
5. Eistetter A.J., Butler P.D., Traut R.R., Fanning T.G. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1999. V. 180. P. 345–349.
6. Makarova K.S., Ponomarev V.A., Koonin E.V. // *Genome Biol.* 2001. V. 2. Research 0033.
7. Gabriel S.E., Helmann J.D. // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 6116–6122.
8. Plevoda B., Sherman F. // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 65. P. 590–606.
9. Chang C.N., Chang N. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 468–477.
10. Dognin M.J., Wittmann-Liebold B. // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 112. P. 131–151.
11. Chang F.N., Cohen L.B., Navickas I.J., Chang C.N. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 4994–4998.
12. Colson C., Lhoest J., Urlings C. // *Mol. Gen. Genet.* 1979. V. 169. P. 245–250.
13. Demirci H., Gregory S.T., Dahlberg A.E., Jogle G. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 567–577.
14. Demirci H., Gregory S.T., Dahlberg A.E., Jogle G. // *Structure.* 2008. V. 16. P. 1059–1066.
15. Agrawal R.K., Linde J., Sengupta J., Nierhaus K.H., Frank J. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 311. P. 777–787.
16. Cameron D.M., Thompson J., March P.E., Dahlberg A.E. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 319. P. 27–35.

17. Valle M., Zavialov A., Li W., Stagg S.M., Sengupta J., Nielsen R.C., Nissen P., Harvey S.C., Ehrenberg M., Frank J. // *Nat. Struct. Biol.* 2003. V. 10. P. 899–906.
18. Vanet A., Plumbridge J.A., Guerin M.F., Alix J.H. // *Mol. Microbiol.* 1994. V. 14. P. 947–958.
19. Colson C., Smith H.O. // *Mol. Gen. Genet.* 1977. V. 154. P. 167–173.
20. Lhoest J., Colson C. // *Mol. Gen. Genet.* 1977. V. 154. P. 175–180.
21. Muranova T.A., Muranov A.V., Markova L.F., Ovchinnikov Y.A. // *FEBS Lett.* 1978. V. 96. P. 301–305.
22. Lhoest J., Colson C. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 121. P. 33–37.
23. Heurgue-Hamard V., Champ S., Engstrom A., Ehrenberg M., Buckingham R.H. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 769–778.
24. Kaczanowska M., Ryden-Aulin M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007. V. 71. P. 477–494.
25. Chen R., Chen-Schmeisser U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 4905–4908.
26. David C.L., Keener J., Aswad D.W. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 2872–2877.
27. Chang F.N. // *J. Bacteriol.* 1978. V. 135. P. 1165–1166.
28. Gudkov A.T. // *FEBS Lett.* 1997. V. 407. P. 253–256.
29. Brosius J., Chen R. // *FEBS Lett.* 1976. V. 68. P. 105–109.
30. Chang C.N., Schwartz M., Chang F.N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 73. P. 233–239.
31. Polevoda B., Sherman F. // *Genome Biol.* 2002. V. 3. Review 0006.
32. Vetting M.W., Bareich D.C., Yu M., Blanchard J.S. // *Protein. Sci.* 2008. V. 17. P. 1781–1790.
33. Miao L., Fang H., Li Y., Chen H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 357. P. 641–647.
34. Wittmann-Liebold B., Greuer B. // *FEBS Lett.* 1978. V. 95. P. 91–98.
35. Janda I., Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1985. V. 201. P. 433–436.
36. Yoshikawa A., Isono S., Sheback A., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1987. V. 209. P. 481–488.
37. Poot R.A., Jeeninga R.E., Pleij C.W., van Duin J. // *FEBS Lett.* 1997. V. 401. P. 175–179.
38. Cumberlidge A.G., Isono K. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 131. P. 169–189.
39. Roy-Chaudhuri B., Kirthi N., Kelley T., Culver G.M. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 68. P. 1547–1559.
40. White-Ziegler C.A., Black A.M., Eliades S.H., Young S., Porter K. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 4334–4342.
41. Yaguchi M. // *FEBS Lett.* 1975. V. 59. P. 217–220.
42. Isono K., Isono S. // *Mol. Gen. Genet.* 1980. V. 177. P. 645–651.
43. Recht M.I., Williamson J.R. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. P. 35–48.
44. Terhorst C., Moller W., Laursen R., Wittmann-Liebold B. // *Eur. J. Biochem.* 1973. V. 34. P. 138–152.
45. Tanaka S., Matsushita Y., Yoshikawa A., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1989. V. 217. P. 289–293.
46. Isono S., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1981. V. 183. P. 473–477.
47. Ramagopal S., Subramanian A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. P. 2136–2140.
48. Gordiyenko Y., Deroo S., Zhou M., Videler H., Robinson C.V. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 380. P. 404–414.
49. Vetting M.W., de Carvalho L.P., Roderick S.L., Blanchard J.S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 22108–22114.
50. Funatsu G., Yaguchi M., Wittmann-Liebold B. // *FEBS Lett.* 1977. V. 73. P. 12–17.
51. Post L.E., Nomura M. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 4660–4666.
52. Kowalak J.A., Walsh K.A. // *Protein. Sci.* 1996. V. 5. P. 1625–1632.
53. Anton B.P., Saleh L., Benner J.S., Raleigh E.A., Kasif S., Roberts R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 1826–1831.
54. Booker S.J., Cicchillo R.M., Grove T.L. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007. V. 11. P. 543–552.
55. Fontecave M., Mulliez E., Atta M. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 209–210.
56. Lee K.H., Saleh L., Anton B.P., Madinger C.L., Benner J.S., Iwig D.F., Roberts R.J., Krebs C., Booker S.J. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. P. 10162–10174.
57. Strader M.B., Costantino N., Elkins C.A., Chen C.Y., Patel I., Makusky A.J., Choy J.S., Court D.L., Markey S.P., Kowalak J.A. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2011. V. 10. M110.005199.
58. Arragain S., Garcia-Serres R., Blondin G., Douki T., Clemancey M., Latour J.M., Forouhar F., Neely H., Montelione G.T., Hunt J.F., et al. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 8. P. 5792–5801.
59. Asatryan L.S., Spirin A.S. // *Mol. Gen. Genet.* 1975. V. 138. P. 315–321.
60. Hitz H., Schafer D., Wittmann-Liebold B. // *FEBS Lett.* 1975. V. 56. P. 259–262.
61. Hitz H., Schäfer D., Wittmann-Liebold B. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. P. 497–512.
62. Schnier J., Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1986. V. 204. P. 126–132.
63. Reeh S., Pedersen S. // *Mol. Gen. Genet.* 1979. V. 173. P. 183–187.
64. Kang W.K., Icho T., Isono S., Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1989. V. 217. P. 281–288.
65. Kade B., Dabbs E.R., Wittmann-Liebold B. // *FEBS Lett.* 1980. V. 121. P. 313–316.
66. Kitakawa M., Blumenthal L., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1980. V. 180. P. 343–349.
67. Koonin E.V., Bork P., Sander C. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 2166–2167.