

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МАЛЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ РНК И БЕЛОК Hfq

©2015 г. В. Н. МУРИНА, А. Д. НИКУЛИН

Институт белка РАН, г. Пуццино

I. Введение. II. Открытие регуляторных РНК. III. Роль малых РНК в бактериях. IV. Роль белка Hfq в функционировании малых РНК. V. Детализация модели взаимодействия белка Hfq с матричными и регуляторными РНК. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

После того, как было обнаружено, что основная наследственная информация закодирована в хромосомной ДНК (описано в [1, 2]), а Сенглером с коллегами был открыт способ ее секвенирования [3], были определены последовательности ДНК различных организмов, в том числе человека – проект Геном человека был начат в 1990 году и завершен в 2003 году [4, 5]. Расшифровка генома показала, что не вся ДНК кодирует белки, рибосомные и транспортные РНК. Еще раньше были выявлены «некодирующие» участки ДНК в бактериях и было предположено, что они не выполняют важных функций в клетке и, следовательно, являются балластом или «мусорной» ДНК [6]. Позднее было обнаружено, что «мусорная» ДНК транскрибируется и кодирует регуляторные РНК, а также мобильные трансгеномные элементы – транспозоны [7]. И те, и другие выполняют важную роль в жизнедеятельности всех живых организмов. В данном обзоре будет рассмотрена малая часть продуктов «мусорной» ДНК, а именно регуляторные РНК и их взаимодействие с белком Hfq, являющимся глобальным регулятором экспрессии генов в граммотрицательных бактериях.

II. ОТКРЫТИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК

В бактериях первыми были обнаружены регуляторные РНК, закодированные в нехромосомных генетических элементах, а именно в плазмиде ColE1 (RNAI) [8] и транспозоне *Tn10* [9]. Их называли малыми регуляторными РНК (мРНК) или некодирующими РНК (нкРНК),

Адрес для корреспонденции: thyrada@rambler.ru

Работа поддержана грантом РФФИ №14-14-00496.

в англоязычной литературе – sRNA и ncRNA, соответственно. В дальнейшем на одном из самых изученных организмов – *Escherichia coli* – было показано, что во многих случаях регуляция трансляции матричных РНК малыми регуляторными РНК происходит при посредничестве белка Hfq.

Наличие регуляторных РНК в эукариотах было показано в 1993 году. Эукариотическая регуляторная РНК (miRNA, microRNA, мкРНК) *lin-4* впервые была обнаружена при исследовании нематоды *Caenorhabditis elegans*. Было показано, что данная РНК не кодирует белок и негативно регулирует трансляцию матричной РНК *lin-14* за счет частично комплементарного спаривания с семью повторами, содержащимися в 3'-нетранслируемой области мРНК *lin-14* [10]. На данный момент существует разделение эукариотических регуляторных РНК по длине – длинные некодирующие РНК (lncRNA), по механизму действия – малые интерферирующие РНК (siRNA), по локализации в клетке – малые ядрышковые и ядерные РНК (snoRNA и snRNA) и вне клетки – exRNA, по размеру – микроРНК (miRNA), по посредникам при взаимодействии – piRNA – которые выполняют свои функции совместно с белками piwi.

Только в 2002 году биоинформационными методами были предсказаны регуляторные РНК в археях. В 2009 году была протестирована первая из обнаруженных архейных мРНК Gō1 из *Methanosarcina mazei* (подробно рассмотрено в [11] и [12]). Оказалось, что некоторые из мРНК в археях содержат короткие участки открытых рамок считывания (ORF) и способны совмещать функции матричных и регуляторных РНК [13].

III. РОЛЬ МАЛЫХ РНК В БАКТЕРИЯХ

В течение последних 30 лет были обнаружены и изучены более 100 малых регуляторных РНК в бактериях, от 80 до 100 регуляторных РНК были обнаружены в *E.coli* [14, 15]. Их исследования показали, что не только белки участвуют в регуляции жизнедеятельности бактерий. Особенно интересным оказалось то, что у бактерий, вызывающих заболевания человека и животных, малые регуляторные РНК участвуют в обеспечении их вирулентности и резистентности к антибиотикам [16]. На данный момент более изучены малые регуляторные РНК из грамотрицательных бактерий, в которых работает система регуляции трансляции РНК, включающая в себя такие компоненты как РНКазы E, деградосома и белок Hfq. В грамположительных бактериях отсутствует РНКазы E, и белок Hfq не прини-

мает такого участия в регуляции трансляции мРНК. Возможно, что в грамположительных бактериях действуют другие, еще не изученные механизмы регуляции трансляции мРНК посредством регуляторных РНК. Далее мы будем рассматривать взаимодействие мРНК с мРНК и белком Hfq в грамотрицательных бактериях.

Малые регуляторные РНК нарабатываются в бактериальной клетке в условиях клеточных стрессов, таких как дефицит глюкозы или железа, воздействие окислителя, радиации или неблагоприятной температуры и других стрессовых факторов. Действие малых РНК на трансляционную активность матричных РНК обеспечивается механизмами, которые описаны ниже. Для обеспечения регуляции трансляции малых регуляторных РНК используют свою частичную комплементарность к участкам матричной РНК, формируя при этом дуплексы РНК, которые не могут быть прочитаны бактериальной системой трансляции, при этом, из-за наличия сопряженности между транскрипцией и трансляцией матричных РНК бактерий, при остановке трансляции, останавливается также и транскрипция матричных РНК.

Перевод информации, закодированной в последовательности нуклеотидов матричной РНК, в аминокислотную последовательность белковых молекул во всех известных живых организмах осуществляется макромолекулярным рибонуклеотидным комплексом – рибосомой. В клетках прокариот хромосомная ДНК расположена в цитоплазме и не отделена мембраной ядра, как в эукариотах, поэтому матричная РНК становится доступной для рибосом сразу после транскрипции с ДНК, таким образом, в бактериальных клетках процессы транскрипции и трансляции происходят одновременно, то есть сопряжены. Одна из форм негативной регуляции трансляции матричной РНК при помощи малых регуляторных РНК обеспечивается за счет рассопряжения процессов транскрипции и трансляции.

Накапливающаяся в клетке малая регуляторная РНК может специфично ингибировать трансляцию матричной РНК, формируя с ней дуплекс за счет частичной комплементарности нуклеотидных последовательностей. В большинстве известных случаев малая РНК комплементарна сайту связывания рибосом на матричной РНК, при этом формирование дуплекса между малой регуляторной РНК и матричной РНК приводит к закрытию участка последовательности матричной РНК (RBS – ribosome binding site), с которым обычно происходит связывание рибосомы, и в результате рибосома не связывается с матричной РНК. Происходит ингибирование инициации трансляции, что приводит к терминации транскрипции по Rho-зависимому или

Rho-независимому механизму, в зависимости от типа матричной РНК. Необратимость ингибирования процессов трансляции-транскрипции обеспечивается ферментативным распадом матричной РНК. Распад РНК начинается РНКазой III, которая расщепляет дуплексы мРНК-мРНК, или РНКазой E, которая расщепляет одноцепочечные участки РНК, не закрытые рибосомами. Полное расщепление ингибируемой матричной РНК осуществляется деградосомой.

Малые регуляторные РНК могут осуществлять регуляцию транскрипции и в том случае, если они комплементарны не сайту связывания рибосом на матричной РНК, а любой кодирующей последовательности матричной РНК. В данном случае происходит ингибирование трансляции на стадии элонгации за счет образования дуплекса мРНК и ее целевой мРНК, который не может быть прочитан рибосомой. Затем происходит расслабление процессов трансляции-транскрипции и деградация матричной РНК по тому же механизму, что описан в предыдущем абзаце.

Позитивная регуляция трансляции мРНК при помощи малых регуляторных РНК подразделяется на прямую и опосредованную РНК мимикрией. Прямая позитивная регуляция осуществляется за счет открытия доступа рибосом к старт-кодону или за счет изменения процесса редактирования мРНК, что приводит к повышению ее стабильности. Механизм не прямой позитивной регуляции осуществляется за счет мимикрии регуляторной РНК под матричную РНК, что приводит к разбавлению общего пула расщепляемой мРНК, при этом доля расщепляемой мРНК снижается [17].

ПРИМЕРЫ НЕГАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Наиболее подробно на данный момент изучена регуляция трансляции матричной РНК *rpoS*. Ген *rpoS* кодирует альтернативный сигма-фактор РНК-полимеразы, который индуцируется при клеточных стрессах (голодание, кислый или щелочной pH, осмотический шок, стационарная фаза) и запускает экспрессию генов, кодирующих белки стресс-ответа. В отсутствие клеточных стрессов трансляция мРНК *rpoS* автоингибируется за счет внутренней шпилечной структуры 5'-концевого участка нетранслируемой области вблизи старт-кодона.

Негативная регуляция трансляции сигма-фактора RpoS осуществляется при помощи мРНК OxyS. Эта первая малая регуляторная РНК была открыта Джизеллой Сторц в 1985 году при изучении влияния пероксида водорода на жизненные процессы в клетке. Сторц обнаружила, что после обработки клеток перекисью водорода в них в значительной степени накапливается 109 нуклеотидная РНК OxyS

[18]. В дальнейшем было показано, что данная малая регуляторная РНК нарабатывается в клетке при окислительном стрессе, ингибирует трансляцию матричных РНК *rpoS* и *fhlA* и некоторых других, блокируя сайт связывания рибосом [15, 19].

Позднее были открыты десятки новых регуляторных РНК, исследованы механизмы их действия. Одной из таких РНК оказалась регуляторная РНК RyhB. Механизм ее действия интересен тем, что в нем принимает участие дополнительный, специфический для регуляции метаболизма железа белок Fur. Роль белка Fur заключается в том, что он является репрессором трансляции сразу шести мРНК, кодирующих железо-связывающие белки *E.coli* [20]. Помимо ингибирования трансляции данных матричных РНК, при связывании с ними белка Hfq и мРНК RyhB, происходит деградация матричных РНК РНКазой E [21].

По схожему механизму регулируется синтез мРНК *ptsG*, кодирующей мембранный компонент специфичного к глюкозе фермента П фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы [22]. В результате сахарофосфатного стресса, при котором в клетке накапливаются глюкоза-6-фосфат или ее производные, происходит индукция мРНК SgrS при участии белка SgrR. Белок SgrS, в свою очередь, в комплексе с РНКазой E и белком Hfq за счет взаимодействия с частично комплементарным участком мРНК *ptsG*, приводит к ингибированию инициации трансляции мРНК. В дальнейшем происходит деградация мРНК РНКазой E [23–25].

Интересный механизм негативной регуляции трансляции при помощи Hfq и мРНК *chiPQ* осуществляется в клетках *E.coli* для полицистронных матриц. Как известно, транскрипция и трансляция мРНК в бактериальных клетках сопряжены и протекают одновременно. При комплементарном спаривании мРНК ChiX с ее целевой мРНК *chiPQ* блокируется сайт связывания рибосом на мРНК, что приводит к терминации транскрипции мРНК через открытие доступа для терминатора транскрипции Rho. В результате следующий ген не транскрибируется, а полученный комплекс мРНК и мРНК разрушается РНКазой E [26].

Другой механизм для регуляции трансляции полицистронных матриц осуществляется при участии Hfq и мРНК Spot42 в процессах метаболизма сахара. Данная мРНК кодируется геном *spf*, который ингибируется комплексом рецепторного белка SRP с цикло-АМФ (сАМР). Оперон *galETKM* содержит два перекрывающихся промотора P1 и P2, причем комплекс сАМР-CRP стимулирует транскрипцию генов первого промотора и ингибирует транскрипцию генов второго

промотора P2. В первом промоторе закодирована UDP-галактозная эпимераза (продукт гена *galE*) и галактокиназа (продукт гена *galK*). Если галактокиназа необходима только при недостатке глюкозы, чтобы расщеплять галактозу, то UDP-галактозная эпимераза играет роль не только при недостатке глюкозы, но также участвует и в других условиях роста клетки в синтезе UDP-глюкозы, строительного блока клеточной стенки и капсулы. Spot42 мРНК частично комплементарна области инициации трансляции гена *galK* и при связывании ингибирует трансляцию мРНК *galK*, блокируя сайт посадки рибосом, но не ингибирует трансляцию мРНК *galE* данного промотора, тем самым приводя к раскоординированию экспрессии генов *gal* оперона [27, 28]. Помимо *gal* оперона Spot42 мРНК регулирует как минимум 14 других оперонов, кодирующих белки для использования альтернативных источников углерода, некоторые из них обратно регулируются также комплексом cAMP–CRP [29].

ПРИМЕРЫ ПОЗИТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Три мРНК (*DsrA*, *ArcZ* и *RprA*) способны связываться с 5'-нетранслируемой областью мРНК *RpoS*, расплетая ее структуру и открывая доступ для посадки рибосом [28, 30]. Промотор *dsrA* активируется при пониженных температурах, ниже 30°C [31, 32], активирует экспрессию сигма фактора *RpoS*, который в свою очередь, активирует экспрессию генов *otsA* и *otsB*, регулирующих уровень дисахарида трегалозы (микозы), защищающей клетку в условиях низких (порядка 4°C) температур [33]. Кроме того, мРНК *DsrA* негативно регулирует экспрессию гена *hns*, кодирующего множественный регулятор транскрипции HNS. Известно, что HNS негативно регулирует гены, ответственные за защиту клетки от осмотического стресса, следовательно, *DsrA* снимает негативный контроль HNS и запускает экспрессию не только генов холодового шока, но и белков защиты от осмотического шока. На примере мРНК *DsrA* было показано, что Hfq ускоряет формирование комплекса *DsrA* и *RpoS* в 30–50 раз [34] и защищает *RpoS* от деградации [35]. Вторая мРНК *RprA*, влияющая на уровень трансляции мРНК *rpoS*, была обнаружена в качестве супрессора в клетках, где отсутствовала мРНК *DsrA*, однако сигнал, который приводит к активации мРНК *RprA* еще не обнаружен [28]. Ингибирование транскрипции третьей мРНК (*ArcZ*) происходит при недостатке кислорода в анаэробных условиях при помощи системы *ArcA*/*ArcB*, в присутствии кислорода в среде негативный контроль снимается [36].

IV. РОЛЬ БЕЛКА HFQ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МАЛЫХ РНК

Регуляция трансляции бактериальных мРНК при помощи антисмысловой РНК хорошо описана для плазмид, фагов и транспозонов. В этих случаях регуляторная РНК (мРНК) и целевая РНК закодированы в одном и том же локусе хромосомы, но в противоположных направлениях. Следовательно, регуляторная РНК полностью комплементарна участку мРНК. В этом случае для функционирования мРНК белок Hfq не нужен [37]. Hfq необходим для другого типа регуляторных РНК, которые имеют неполную комплементарность с целевыми мРНК, так называемыми транс-кодируемыми РНК. Эти РНК экспрессируются «*in trans*», то есть гены, кодирующие эти регуляторные РНК, расположены далеко от генов, кодирующих их целевые матричные РНК. Было показано, что белок Hfq ускоряет формирование комплекса между двумя частично комплементарными РНК [38–42]. Ускорение образования комплекса может происходить как за счет локального повышения концентрации РНК вблизи белка Hfq при их взаимодействии, так и за счет способности Hfq расплетать двуцепочечные РНК [28, 43, 44]. Кроме того известно, что Hfq защищает некоторые короткоживущие мРНК от деградации РНКазой E (например DsrA, Spot 42, RyhB) [41, 45, 46].

Помимо регуляции трансляции мРНК опосредованно через регуляторные РНК, Hfq обладает способностью напрямую изменять уровень трансляции мРНК через изменение времени полужизни мРНК. Наиболее изучена дестабилизация мРНК в присутствии белка Hfq на примере мРНК *ompA*. Данная мРНК кодирует мажорный белок OmpA внешней мембраны *E. coli*. Стабильность данной мРНК обратно пропорциональна скорости роста клеток. Время полужизни мРНК определяется 5'-нетранслируемой областью, которая содержит как стабилизирующую шпилечную структуру, так и сайт для расщепления РНКазой E. В быстрорастущих клетках рибосомы, связываясь с 5'-нетранслируемой областью мРНК, защищают ее от деградации РНКазой E. В медленно растущих клетках (в стационарной фазе роста) накапливается белок Hfq, который конкурирует с рибосомами за 5'-нетранслируемую область на мРНК, препятствует посадке рибосом, что приводит к деградации мРНК, освобождая сайт связывания для РНКазы E [46–48].

Hfq имеет три сайта связывания с РНК, которые за счет повторяемости мономеров формируют две основных области связывания – область связывания У-богатых последовательностей РНК на проксимальной стороне тороида и область взаимодействия с поли(А)

участками РНК на дистальной стороне. В настоящее время известно несколько структур комплексов Hfq с короткими РНК-олигомерами (PDBID 4HT8, 4HT9, 3QSU, 3RER, 3AHU, 3HSB, 3GIB, 1KQ2) и недавно получена структура низкого разрешения белка Hfq с мРНК RydC из *Salmonella sp.* (PDB ID 4V2S) [49].

Структуры Hfq в комплексе с олиго(У) фрагментами РНК показали детали взаимодействия У-богатых РНК на дистальной поверхности белка вблизи центральной поры гексамера [48, 50, 51]. Это структура Hfq из *Staphylococcus aureus* в комплексе с AU5G РНК [52], структура Hfq из *Salmonella typhimurium* в комплексе с U6 РНК [53] и структура Hfq из *E. coli* в комплексе с AU6A РНК [54].

Сайт связывания урацила организован аминокислотными остатками двух соседних субъединиц гексамера. Основание урацила при связывании с белком образует стэкинг с бензольным кольцом Phe42, а атомы O2 и O4 урацила образуют водородные связи с атомами боковых цепей Gln8 и Gln41 соответственно [53]. Следует отметить, что между тремя структурами комплексов Hfq с У-богатыми РНК наблюдаются некоторые отличия. В ассиметричной ячейке структуры комплекса Hfq из *Salmonella typhimurium* расположен мономер белка и один уридин с симметричными фосфатными остатками, причем свободные кислороды фосфата не формирует связей с белком и направлены в центральную пору [53]. В структуре комплекса Hfq из *Staphylococcus aureus* с AU5G РНК свободные кислороды фосфатной группы направлены от центральной поры и формируют водородные связи с NH₂-группой остатка His56 [52].

Последняя из полученных на данный момент структур комплексов Hfq с У богатыми РНК [54] показала, что связывание РНК на проксимальной стороне тороида может быть лабильным. Для сокристаллизации с Hfq был взят участок DsgA РНК, содержащий последовательность AU₆A. Оказалось, что в полученной структуре комплекса не все нуклеотиды локализованы в уридин-связывающем кармане: два из шести уридинов (U30 и U33) не имеют контактов с белком и направлены от поверхности белка, один уридин (U29) связан не в самом кармане, где должен был сформировать стэкинг с Phe42, а вблизи кармана. Сахарофосфатный остов РНК ориентирован как внутрь центральной полости (как в комплексе Hfq с U₆ РНК), так и от центральной полости (как в комплексе Hfq с AU₅G РНК).

Структура Hfq из *E. coli* с олиго(А) РНК длиной 15 нуклеотидов была получена впервые в 2009 году [55]. Она показала, что олиго(А) связывается на дистальной поверхности белка посредством повторяющегося тройственного мотива, названным А-Р-Е РНК-связываю-

щий мотивом. Изначально предполагалось, что А-сайт соответствует специфическому аденин-связывающему карману, R-сайт – пурин-связывающему карману, а Е-сайт является сайтом для неспецифического связывания нуклеотидов, поскольку основание нуклеотида в нем не имеет контактов с атомами белка [55]. Позднее, однако, было показано, что именно R-сайт является сайтом специфического связывания аденинов [54, 56], причем другой пурин – гуанин – не связывается с Hfq ни в R-сайте, ни в А-сайте, зато в «специфическом для пуринов» R-сайте может связываться цитидин [53, 57].

Дистальный А-связывающий сайт Hfq из *E. coli* располагается между соседними субъединицами тороида Hfq. При связывании РНК с белком происходит формирование водородных связей между Gln33 и N7, N6 атомами основания аденина, остатком Gln52 и N1 атомом основания аденина, остатком Lys31 и фосфатной группой аденозина. Также формируется гидрофобный контакт между Leu32 и основанием аденина [55].

Связывание РНК с белком в R-сайте происходит за счет стэкинг взаимодействия между Tyr25 и основанием аденина, дополненного гидрофобными контактами аденина с остатками Leu26, Ile30, Leu32. Замена Tyr25 на аланин приводит к 100-кратному снижению сродства между РНК и Hfq [58]. Гидрофобные взаимодействия дополняются формированием водородных связей между боковой цепью Gln52 и N6 атомом основания аденина, Thr61 и N1 атомом основания аденина, Asn28 и N3 и N6 атомами основания аденина [55].

Среди грамотрицательных бактерий связывание А-богатых олигоРНК происходит практически идентично. Одновременное связывание AU_6A и A_7 в комплексе с белком из *E. coli* показало, что при формировании тройственного комплекса положение РНК и структура белка практически не изменяются [59].

Однако ничего не было известно о структуре комплексов РНК с Hfq из грамположительных бактерий. В грамположительных бактериях Hfq играет не столь фундаментальную роль, например нокаут гена *hfq* в *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes* не приводит к изменению фенотипа этих бактерий, в том числе из-за отсутствия в них РНКазы E [37]. В 2011 году была получена первая структура Hfq из грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* в комплексе с $(AG)_3A$ РНК [60]. Оказалось, что связывание А-богатых РНК на поверхности Hfq в грамположительных бактериях происходит иначе, чем в грамотрицательных бактериях. Hfq из *Bacillus subtilis* не связывает AU_5G РНК, обладает меньшим сродством к A_{18} РНК, чем белки Hfq из грамотрицательных бактерий, зато специфически

связывает РНК, содержащую АГ повторы. Вместо трех карманов связывания (A-R-E) формируется только два, которые были названы A-L мотивом. Адениновое основание связывается на поверхности белка в кармане А, который является аналогом кармана R грамотрицательных бактерий. Связывание происходит за счет стэкинг взаимодействий между основанием аденина и двумя фенилаланинами белка – Phe24 и Phe29 и стабилизируется за счет водородных связей между аденином и остатками Ser60, Thr61 белка. Гуанин в составе (AG)₃А РНК в комплексе с Hfq формирует водородные связи с Arg32, который является строго консервативным аминокислотным остатком среди белков Hfq в грамположительных бактериях [60].

V. ДЕТАЛИЗАЦИЯ МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА Hfq С МАТРИЧНЫМИ И РЕГУЛЯТОРНЫМИ РНК

Из-за невозможности получения стабильных комплексов белка Hfq с полноразмерными регуляторными и матричными РНК, долгое время не была известна полная картина связывания белка с РНК. Для создания моделей взаимодействия белка Hfq с регуляторными мРНК [61–63] использовались данные по структурам комплексов белков Hfq с короткими фрагментами РНК и с отдельными рибонуклеотидами. Оказалось, что поскольку белок Hfq связывает одноцепочечные РНК, то он способен связывать отдельные нуклеотиды в сайтах связывания РНК [64]. Были получены комплексы белка с УТФ, ЦТФ и АТФ, позволившие выявить структурные детали взаимодействия уридина в латеральном сайте белка Hfq, существование которого было показано биохимически [65] и показать способность Hfq связывать цитидины в обоих основных сайтах взаимодействия с РНК (рис. 1). Следует отметить, что несмотря на все попытки, не были получены комплексы белка с гуанином, что подтверждает биохимические данные о низком родстве Hfq к гуанин-содержащим последовательностям РНК [64].

Многие регуляторные РНК, с которыми взаимодействует Hfq, имеют в составе полиуридиновые последовательности как на 3', так и на 5' конце. Предполагается, что первоначально происходит узнавание белком Hfq У-богатой последовательности 3' конца мРНК в проксимальном сайте Hfq [66], а затем 5' конец мРНК формирует связи с повторяющимися латеральными сайтами связывания белка [62] (рис. 2). Именно урацилы, формирующие контакты с латеральным сайтом связывания, могут быть ответственны за взаимодействие с мРНК [67]. По результатам нашей работы удалось детализировать исходную модель и утверждать, что на 3' конце мРНК должны рас-

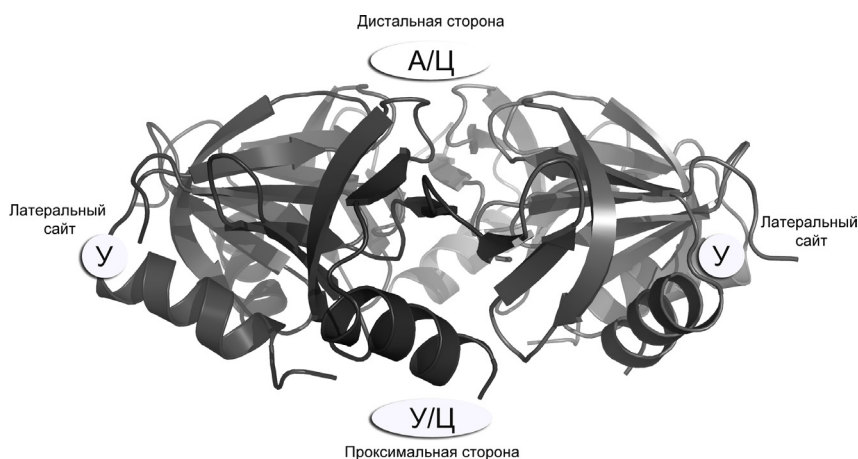


Рис. 1. Схема расположения РНК-связывающих сайтов на поверхности гексамеров белка Hfq и их специфичность к нуклеотидам.

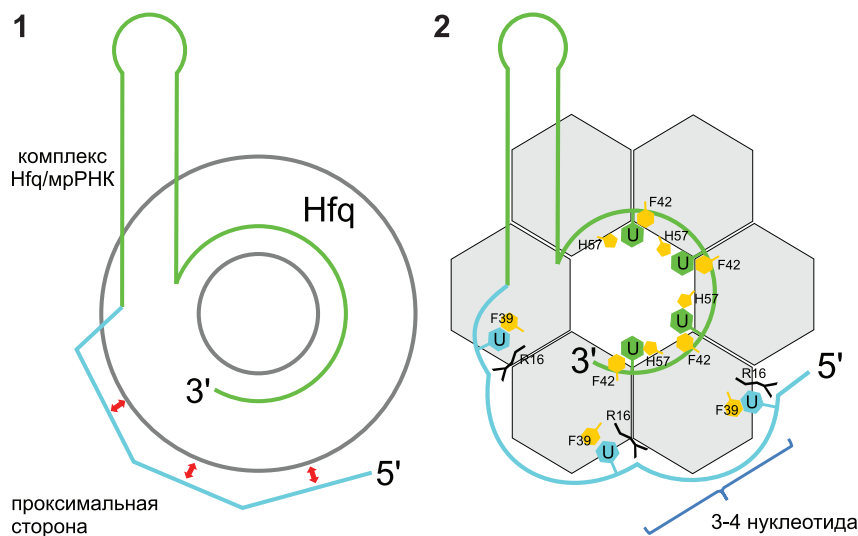


Рис. 2. Предполагаемая модель положения малых регуляторных РНК на поверхности белка Hfq.

1. Исходная модель, предложенная на основе данных по мутагенезу белка Hfq.
2. Детализированная на основе полученных нами структурных данных по локализации УТФ на поверхности белка Hfq модель связывания мРНК. Для связывания с белком мРНК должна иметь на 3' конце 4–5 последовательно расположенных уридина, часть из которых может быть замещена на цитидины, а на 5' конце через каждые 3–4 нуклеотида должен быть строго расположен уридин.

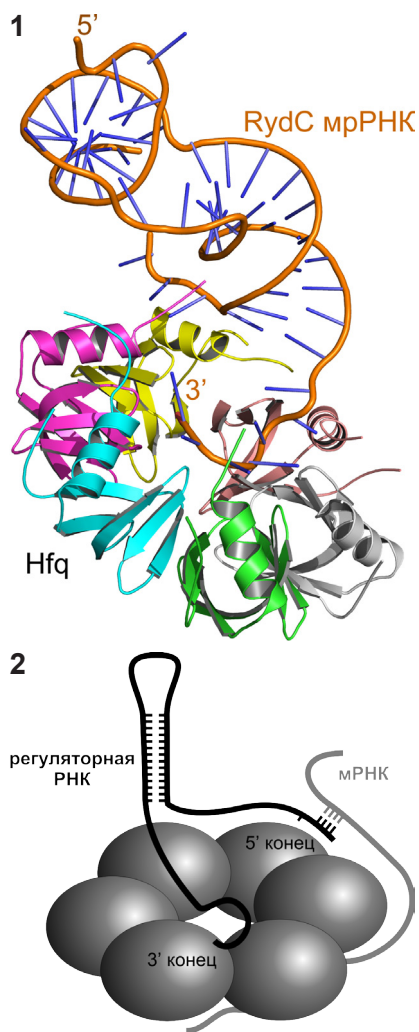


Рис. 3. (1) Структура комплекса RydC мРНК с белком Hfq (HDB ID 4V2S). Гексамер белка Hfq показан в виде ленточной модели с мономерами разного цвета, RydC мРНК показана в виде оранжевой ленты с обозначенным направлением оснований (синие палочки). Обозначены 5' и 3' концы мРНК. 3' конец RydC мРНК образует сеть контактов с аминокислотными остатками проксимальной поверхности белка в центральной области гексамера. С латеральной областью белка взаимодействуют консервативные уридины U23/U24 и U46/U47 мРНК. 5' конец RydC РНК образует дополнительные контакты с латеральной частью гексамера симметрично связанной молекулы белка Hfq (не показано).

(2) Предполагаемая модель взаимодействия RydC мРНК и *cfa* мРНК из *Salmonella sp* на поверхности белка Hfq (упрощенная схема из [49]). 3' конец RydC мРНК (черная) взаимодействует с центральной порой белка на проксимальной поверхности Hfq. *cfa* мРНК (серая) ассоциирована с дистальной поверхностью Hfq и формирует в латеральной области белка дуплекс с 5' концом RydC, который одновременно связан с Hfq. Предполагается, что С-концевая часть Hfq направлена в сторону контакта обеих молекул РНК и стабилизирует их взаимодействие.

полагаться последовательно не менее чем 4–5 уридинов, часть из которых может быть заменена на цитозины, а на 5' конце регуляторной РНК должна быть последовательность, содержащие уридины в каждом 4–5 положении для взаимодействия с латеральными сайтами Hfq [64]. Полученные данные были использованы позднее для создания модели взаимодействия белка Hfq с *groS* мРНК [63], а затем подтверждены структурой белка Hfq из *E. coli* в комплексе с мРНК RydC из *Salmonella sp.* [49] (рис. 3).

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время не представляет сомнений важная роль малых регуляторных РНК в регуляции биосинтеза в бактериальных клетках. Интересной особенностью этих процессов является участие в них бактериального белка Hfq, который выполняет роль РНК-шаперона и способствует взаимодействию мРНК с мРНК-мишенями. Уникальной особенностью этого шестимерного белка служит наличие трех сайтов взаимодействия с РНК на поверхности этого белка: одного уридин-специфического сайта, второго – аденин-специфического сайта, и дополнительного сайта, необходимого для осуществления процесса взаимодействия двух молекул РНК. Процесс регуляции белкового синтеза с участием мРНК и белка Hfq в различных бактериях активно исследуется и здесь следует ожидать еще много интересных открытий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dahm, R. (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev. Biol.*, **278**, 274–288.
2. Portin, P. (2014) The birth and development of the DNA theory of inheritance: Sixty years since the discovery of the structure of DNA. *J. Genet.*, **93**, 293–302.
3. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463–5467.
4. Ikekawa, F., and Ikekawa, S. (2001) Fruits of human genome project and private venture, and their impact on life science. *Yakugaku Zasshi*, **121**, 845–873.
5. Hattori, M. (2005) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **50**, 162–168.
6. Ohno, S. (1972) So much «junk» DNA in our genome. *Brookhaven Symp. Biol.*, **23**, 366–370.
7. Palazzo, A.F., and Gregory, T.R. (2014) The Case for Junk DNA. *PLoS Genet.*, **10(5)**, e1004351.
8. Tomizawa, J., and Som, T. (1984) Control of cole I plasmid replication: Enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the rom protein. *Cell*, **38**, 871–878.
9. Simons, R.W., and Kleckner, N. (1983) Translational control of IS10 transposition. *Cell*, **34**, 683–691.
10. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambro, V. (1993) The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843–854.
11. Babski, J., Maier, L.-K., Heyer, R., Jaschinski, K., Prasse, D., Jäger, D., Randau, L., Schmitz, R.A., Marchfelder, A., and Soppa, J. (2014) Small regulatory RNAs in Archaea. *RNA Biol.*, *Landes Bioscience*, **11**, 484–493.
12. Prasse, D., Ehlers, C., Backofen, R., and Schmitz, R.A. (2013) Regulatory RNAs in archaea: first target identification in Methanoarchaea. *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 344–349.
13. Jäger, D., Sharma, C. M., Thomsen, J., Ehlers, C., Vogel, J., and Schmitz, R.A. (2009) Deep sequencing analysis of the *Methanosarcina mazei* G01 transcriptome in response to nitrogen availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 21878–21882.
14. Livny, J., and Waldor, M.K. (2007) Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 96–101.

15. Altuvia, S. (2007) Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 257–261.
16. Gottesman, S., and Storz, G. (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, 1–16.
17. Marzi, S., and Romby, P. (2012) RNA mimicry, a decoy for regulatory proteins. *Mol. Microbiol.*, **83**, 1–6.
18. Gottesman, S., and Storz, G. (2015) RNA reflections: converging on Hfq. *RNA*, **21**, 511–512.
19. Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., and Storz, G. (1998) The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J.*, **17**, 6061–6068.
20. Massé, E., and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 4620–4625.
21. Massé, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **17**, 2374–2383.
22. Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol. Microbiol.*, **54**, 1076–1089.
23. Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.*, **19**, 2176–2186.
24. Morita, T., Mochizuki, Y., and Aiba, H. (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 4858–4863.
25. Aiba, H. (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 134–139.
26. De Lay, N., Schu, D.J., and Gottesman, S. (2013) Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J. Biol. Chem.*, **288**, 7996–8003.
27. Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol. Cell*, **9**, 23–30.
28. Gottesman, S. (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, **58**, 303–328.
29. Beisel, C.L., Updegrove, T.B., Janson, B.J., and Storz, G. (2012) Multiple factors dictate target selection by Hfq-binding small RNAs. *EMBO J.*, **31**, 1961–1974.
30. Henderson, C.A., Vincent, H.A., Casamento, A., Stone, C.M., Phillips, J.O., Cary, P.D., Sobott, F., Gowers, D.M., Taylor, J.E., and Callaghan, A.J. (2013) Hfq binding changes the structure of *Escherichia coli* small noncoding RNAs OxyS and RprA, which are involved in the riboregulation of rpoS. *RNA*, **19**, 1089–1104.
31. Lease, R.A., Cusick, M.E., and Belfort, M. (1998) Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12456–12461.
32. Majdalani, N., Cunnig, C., Sledjeski, D., Elliott, T., and Gottesman, S. (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12462–12467.
33. Kandror, O., DeLeon, A., and Goldberg, A.L. (2002) Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 9727–9732.
34. Soper, T.J., and Woodson, S.A. (2008) The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA*, **14**, 1907–1917.
 35. McCullen, C.A., Benhammou, J.N., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2010) Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small non-coding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. *J. Bacteriol.*, **192**, 5559–5571.
 36. Mandin, P., and Gottesman, S. (2010) Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J.*, **29**, 3094–3107.
 37. Nielsen, J.S., Lei, L.K., Ebersbach, T., Olsen, A.S., Klitgaard, J.K., Valentin-Hansen, P., and Kallipolitis, B.H. (2010) Defining a role for Hfq in Gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 907–919.
 38. Geissmann, T.A., and Touati, D. (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J.*, **23**, 396–405.
 39. Kawamoto, H., Koide, Y., Morita, T., and Aiba, H. (2006) Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol. Microbiol.*, **61**, 1013–1022.
 40. Rasmussen, A.A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., Franch, T., Petersen, C., and Valentin-Hansen, P. (2005) Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol. Microbiol.*, **58**, 1421–1429.
 41. Sledjeski, D.D., Gupta, A., and Gottesman, S. (1996) The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **15**, 3993–4000.
 42. Chen, S., Zhang, A., Blyn, L.B., and Storz, G. (2004) MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **186**, 6689–6697.
 43. Storz, G., Opdyke, J.A., and Zhang, A. (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 140–144.
 44. Васильева, Ю.М., Гарбер, М.Б. (2002) Регуляторная роль белка Hfq в жизнедеятельности бактериальных клеток. *Молекулярная биология*, **36**, 1–9.
 45. Massé, E., Escorcía, F.E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **17**, 2374–2383.
 46. Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., and Kaberdin, V.R. (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA*, **9**, 1308–1314.
 47. Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V.R., von Gabain, A., and Bläsi, U. (2000) Hfq (HF1) stimulates ompA mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev.*, **14**, 1109–1118.
 48. Valentin-Hansen, P., and Eriksen, M. (2004) MicroReview The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.*, **51**, 1525–1533.
 49. Dimastrogiovanni, D., Fröhlich, K.S., Bandyra, K.J., Bruce, H.A., Hohensee, S., Vogel, J., and Luisi, B.F. (2014) Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. *Elife*, **3**, e05375.
 50. Kovach, A.R., Hoff, K.E., Canty, J.T., Orans, J., Brennan, R.G. (2014) Recognition of U-rich RNA by Hfq from the Gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes*. *RNA*, **20**, 1548–1559.
 51. Мурина В.Н., Никулин А.Д. (2011) РНК-связывающие SM-подобные белки бактерий и архей: сходство и различие структур и функций. *Успехи биологической химии*, **51**, 133–164.

52. Schumacher, M.A., Pearson, R.F., Møller, T., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R. G. (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J.*, **21**, 3546–3556.
53. Sauer, E., and Weichenrieder, O. (2011) Structural basis for RNA 3'end recognition by Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 13065–13070.
54. Wang, W., Wang, L., Zou, Y., Zhang, J., Gong, Q., Wu, J., and Shi, Y. (2011) Cooperation of *Escherichia coli* Hfq hexamers in DsrA binding. *Genes Dev.*, **25**, 2106–2117.
55. Link, T.M., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R.G. (2009) Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyribadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 19292–19297.
56. Hämmerle, H., Beich-Frandsen, M., Večerek, B., Rajkowitsch, L., Carugo, O., Djinović-Carugo, K., and Bläsi, U. (2012) Structural and biochemical studies on ATP binding and hydrolysis by the *Escherichia coli* RNA chaperone Hfq. *PLoS One*, **7**, e50892.
57. Мурина В. Н., Мельник Б. С., Филимонов В. В., Улайн М., Вейсс М. С., Мюллер У., Никулин А. Д. Влияние замен консервативных аминокислотных остатков на структуру и стабильность белка Hfq. (2014) *Биохимия*, **79**, 595–604.
58. Arluison, V., Mutyam, S.K., Mura, C., Marco, S., and Sukhodolets, M.V. (2007) Sm-like protein Hfq: Location of the ATP-binding site and the effect of ATP on Hfq-RNA complexes. *Protein Sci.*, **16**, 1830–1841.
59. Wang, W., Wang, L., Wu, J., Gong, Q., and Shi, Y. (2013) Hfq-bridged ternary complex is important for translation activation of rpoS by DsrA. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5938–48.
60. Someya, T., Baba, S., Fujimoto, M., Kawai, G., and Kumasaka, T. (2012) Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer : insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1856–1867.
61. Robinson, K. E., Orans, J., Kovach, A.R., Link, T.M., and Brennan, R.G. (2013) Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1–14.
62. Sauer, E. (2013) Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biol.*, **10**, 610–618.
63. Peng, Y., Curtis, J.E., Fang, X., and Woodson, S.A. (2014) Structural model of an mRNA in complex with the bacterial chaperone Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 17134–17139.
64. Murina, V., Lekontseva, N., and Nikulin, A. (2013) Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **69**, 1504–1513.
65. Panja, S., Schu, D.J., and Woodson, S.A. (2013) Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7536–7546.
66. Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2013) Lsm proteins and Hfq: Life at the 3'end. *RNA Biol.*, **10**, 592–601.
67. Sauer, E., Schmidt, S., and Weichenrieder, O. (2012) Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 9396–93401.