

© Г.А. Журавлева,
Н.С. Ровинский

Государственный университет,
биолого-почвенный факультет,
кафедра генетики и селекции;
Санкт-Петербург

✿ тмРНК представляет собой небольшую молекулу РНК, которая одновременно проявляет свойства тРНК и мРНК. Эта РНК, обнаруженная только у бактерий, участвует в процессе «транс-трансляции», при котором полипептид синтезируется на матрицах двух разных молекул мРНК, одной из которых и является тмРНК. Основной функцией тмРНК является уменьшение ошибок, возникающих в ходе трансляции, за счет освобождения остановившихся рибосом и деградации aberrантных белков.

✿ **Ключевые слова:** тмРНК; рибосома; синтез белка; транс-трансляция; антибиотики

АДАПТИВНАЯ РОЛЬ тмРНК

ВВЕДЕНИЕ

тмРНК — это бактериальная РНК, объединяющая в себе свойства тРНК и мРНК и представляющая собой небольшую молекулу РНК размером 260-430 нуклеотидов. Она была открыта в 1996 году [7] и известна также под следующими названиями: tmRNA (transfer-messenger RNA), 10SaRNA, или SsgA RNA. Основной функцией тмРНК является завершение трансляции aberrантных мРНК на остановившихся рибосомах и направление таких мРНК на деградацию [1] (рис. 1). Остановка рибосом может происходить при отсутствии стоп-кодона на мРНК, при наличии на мРНК «голодных» кодонов (кодонов, для которых в клетке нет аминокислотированных тРНК), и, наконец, когда мРНК образует термодинамически стабильную трехмерную структуру, мешающую дальнейшему продвижению рибосомы [13].

Все изученные эубактерии содержат тмРНК, что свидетельствует о том, что она возникла еще до дивергенции отдельных филогенетических ветвей эубактерий. Была ли она впоследствии потеряна у архей и эукариот или появление тмРНК является адаптивным приобретением только эубактерий? Вопрос этот остается открытым и является предметом оживленных дискуссий в свете предположений о термофильном происхождении прокариот и гипотезе «мира РНК» [4, 9].

СТРУКТУРА тмРНК

тмРНК состоит из высококонсервативных последовательностей, которые образуют структуру, напоминающую акцепторный стебель тРНК [1]. На 3'- и 5'-концах тмРНК рядом с участками, входящими в акцепторный стебель, располагаются участки, формирующие Т- и D-петли, соответственно [8]. Следует отметить, что D-петля по своей структуре отличается от D-петли тРНК (рис. 2). Эти участки формируют трехмерную структуру, напоминающую L-форму тРНК, хотя в «локтевой» части молекулы угол между двумя стеблями на 10–20° больше, чем соответствующий угол на тРНК [8]. мРНК-подобный домен тмРНК с 5'-конца граничит с первым псевдоузлом. С 3'-конца за мРНК-подобным доменом следует второй, третий и четвертый псевдоузлы. Сам мРНК-подобный домен состоит из открытой рамки считывания, кодирующей от десяти до двадцати семи аминокислот [8] (рис. 3).

ФУНКЦИИ тмРНК

тмРНК присутствует в клетке в количестве 100–10 000 копий. После синтеза тмРНК происходит ее процессинг: с 5'-конца РНК-аза Р удаляет 7 пар оснований, а с 3'-конца происходит удаление пары оснований РНК-азой III или РНК-азой E [13]. Далее происходит удаление нескольких пар оснований РНК-азой Т и РНК-азой РН. У *Bacillus subtilis* триплеклоид

ССА на 3'-конце не кодируется геном тмРНК, а добавляется нуклеотидилтрансферазой посттранскрипционно [8].

После созревания тмРНК связывается с белком SmpV (**s**mall **p**rotein **V**) [2]. Такой комплекс распознается аланил-тРНК-синтетазой, которая «заряжает» тмРНК аланином. «Заряженная» тмРНК распознается EF-Tu*ГТФ, который переносит ее в остановившуюся рибосому [1], [2]. В рибосоме происходит взаимодействие первого псевдоузла и одноцепочечной последовательности, находящейся вверх по течению от открытой рамки считывания, с белком S1 [8]. На первом этапе взаимодействия с рибосомой тмРНК действует как тРНК, размещаясь в А-сайте рибосомы. Далее происходит перенос пептидной цепи на аланиновый остаток на тмРНК с последующим замещением проблемной мРНК на мРНК-подобный домен тмРНК и трансляцией тмРНК [3]. Существуют данные, что РНК-аза R, связанная с комплексом тмРНК-SmpV, способна разрушать проблемную мРНК. Предполагается, что в ее деградации также принимают участие плохо изученные РНК-азы, способные разрушать РНК, находящуюся в А-сайте рибосомы [2]. В результате синтеза олигопептида, закодированного в мРНК-подобном домене происходит образование химерного белка, который несет олигопептидную метку, распознаваемую бактериальными системами протеолиза [6]. Такой процесс синтеза белка с двух матриц называется транс-трансляцией.

ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ, «ПОМЕЧЕННЫХ» тмРНК

К бактериальным системам протеолиза, распознающим «помеченные» посредством тмРНК белки, относятся ClpXP/AP и HflV (FtsH), в цитоплазме, а также система протеолиза Tsp в периплазме [6].

Комплекс белков ClpXP/AP состоит из шести субъединиц белка ClpX или ClpA, которые образуют камеру и ClpP, который представляет собой сериновую протеазу из четырнадцати субъединиц. ClpX/A принадлежит к семейству АТФ-аз Hsp100. Этот белок распознает метку деградации, считанную с ORF тмРНК, производит денатурацию белка и транслирует денатурированный полипептид в тетрадекамер ClpP, где он подвергается протеолизу.

Система FtsH также осуществляет АТФ-зависимую денатурацию белка, она представляет собой связанную с мембраной цинковую протеазу. Эта протеаза может осуществлять протеолиз как мембранных, так и некоторых цитоплазматических белков.

Периплазматическая система протеолиза реализуется мономерным белком Tsp. Tsp не требует для своей работы затрат АТФ. На белке Tsp есть участок, имеющий гомологию с PDZ доменом белков млекопитающих. Этот

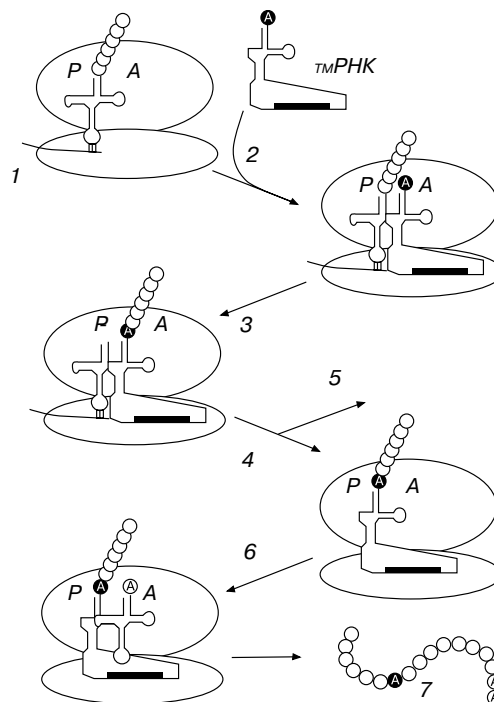


Рис. 1. Этапы функционирования тмРНК (модифицировано из [8]):

В случае нарушения элонгации трансляции происходит остановка рибосомы (1), с А-сайтом которой связывается тмРНК (2); в результате этого процесса происходит перенос пептида на тмРНК (3), транслокация тмРНК из А- в Р-сайт рибосомы (4), освобождение мРНК (5), связывание тРНК с А-сайтом рибосомы (6) и освобождение «меченого» белка (7).

домен отвечает за распознавание «метки» деградации. После связи «помеченного» белка с PDZ доменом, происходит его спонтанная денатурация, что делает возможным деградацию белка протеазным доменом Tsp. Эта система протеолиза не может разрушить стабильные белки, так как их денатурация будет затруднена.

ЭВОЛЮЦИЯ тмРНК

тмРНК и необходимый для ее функционирования белок SmpV были найдены у всех видов бактерий, в том числе и у *Mycoplasma genitalium* [6]. Этот факт говорит о том, что тмРНК играет большую биологическую роль. Делеция гена тмРНК не всегда приводит к летальному эффекту, хотя она вызывает ослабление роста при стрессовых условиях, таких, как повышенная температура, сублетальные концентрации антибиотиков или повышенная концентрация этанола. Следует отметить, что ген тмРНК является жизненно важным для *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* и *Mycobacterium tuberculosis*, но не является необходимым для *Escherichia coli*. Это можно объяснить двумя способами:

· У *E. coli* имеется дополнительная система для высвобождения остановившихся рибосом;

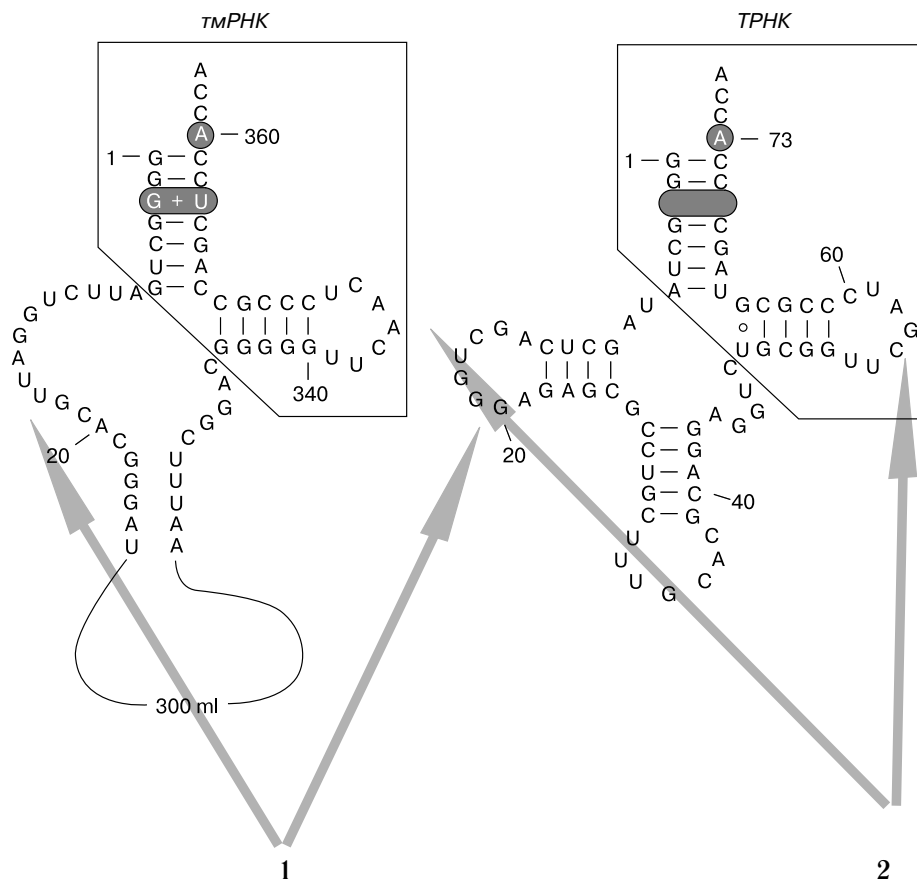


Рис. 2. Структура тРНК-подобного домена тмРНК (модифицировано из [8]):

1 — D-петля; 2 — T-петля, тмРНК — транспортная-матричная РНК; мРНК — матричная РНК; темным кружком и овалом обозначены основания, существенные для распознавания аланил-тРНК-синтетазой.

Процесс высвобождения остановившихся рибосом и контроля качества синтезированного белка является жизненно важным только для некоторых бактерий, или для бактерий, живущих в определенных условиях.

Было показано, что структура тмРНК может различаться у различных видов бактерий. Так, например, у *Caulobacter crescentus* и у *Rickettsia prowazekii* тмРНК формирует необычную структуру, состоящую из двух цепей [13] (рис. 4). Интересно также отметить, что ген, кодирующий тмРНК, присутствует в митохондриях *Reclinomonas americana*. Эта тмРНК, по всей видимости, не выполняет никаких функций и является рудиментом тмРНК предков митохондрий. Ген тмРНК также присутствует в хлоропластах [13]. Поиски гена тмРНК у эукариот и архей не увенчались успехом [6]. По всей видимости, у эукариот нет необходимости в функциях тмРНК, так, как трансляция идет только с мРНК, которые прошли процессинг и были транспортированы из ядра в цитоплазму [3]. Такая система контроля позволяет избежать присутствия в цитоплазме мРНК, у которых отсутствуют стоп-кодоны.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ тмРНК

Значение тмРНК для освобождения остановившихся рибосом

По всей видимости, наиболее важной функцией тмРНК является освобождение остановившихся рибосом [12] (рис. 5). Это подтверждается тем фактом, что замена последовательности аминокислот, кодируемой открытой рамкой считывания тмРНК, на другую последовательность, которая не распознается протеазами, как правило, не приводит к мутантному фенотипу [6]. Более того, было показано, что у *Neisseria gonorrhoeae* лишь одна из двух основных функций тмРНК является жизненно необходимой — это именно освобождение остановившихся рибосом, а не введение «метки деградации» в aberrantные белки [1].

Роль тмРНК в жизненном цикле бактериофагов

тмРНК необходима для развития некоторых бактериофагов, в том числе фага P22. Это объясняется тем, что для развития этих фагов необходим белок, чувстви-

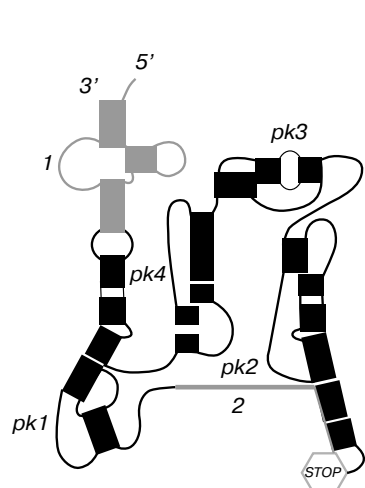


Рис. 3. Структура тмРНК (модифицировано из [2]):

1 — тРНК-подобный домен;
2 — мРНК-подобный домен;
pk1, pk2, pk3 и pk4 — первый, второй, третий и четвертый псевдоузлы соответственно,
STOP — стоп-кодон внутренней открытой рамки считывания тмРНК.

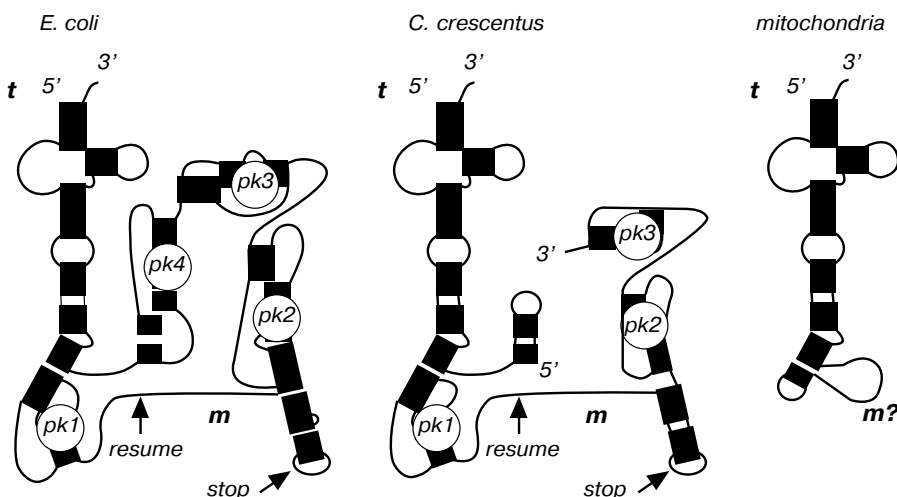


Рис. 4. Полиморфизм тмРНК (из [13]):

t — тРНК-подобный домен, m — мРНК-подобный домен на внутренней рамке считывания тмРНК, resume — первый кодон внутренней рамки считывания тмРНК; остальные обозначения как на рис. 3.

тельный к действию протеазного комплекса ClpXP/AP. Этот белок в норме присутствует в клетке зараженной бактерии в маленьких количествах. В отсутствии тмРНК на полисомах происходит блокировка рибосом, что приводит к уменьшению количества синтезированного белка. Таким образом, количество фагового белка также падает и становится недостаточным для развития фага [12].

Влияние тмРНК на патогенность бактерий

Джулио с соавторами показали, что у *Salmonella enterica* (серотип *Tiphimurium*) делеция гена тмРНК приводит к отсутствию патогенности [5]. У этой бактерии тмРНК участвует в регуляции экспрессии специфических генов во время инфекции. Интересно отметить, что у *Salmonella* за 3'-концом гена тмРНК располагаются гены вирулентности [1, 5]. Более того, на границе между генами вирулентности и геном, кодирующим тмРНК, расположен сайт прикрепления Р4-подобных фагов *attL*. Было показано, что такие же сайты располагаются на границах последовательностей, содержащих гены, определяющие патогенность, у *Vibrio cholerae* и *Dichelobacter nodosus* [5].

Регуляция генной экспрессии посредством тмРНК

Было показано, что репрессор LacI, связываясь с оператором *lac*-оперона, который перекрывается с ге-

ном *lacI*, приводит к преждевременной термации транскрипции этого гена [12]. Это приводит к синтезу мРНК без стоп-кодона, что, в свою очередь, приводит к остановке рибосомы и синтезу аномального белка-репрессора LacI, который подвергается «мечению» и дегградации. Было показано, что у мутантов с делецией гена тмРНК наблюдается задержка в индукции *c*-оперона [12]. По всей видимости, механизм транс-трансляции играет важную роль в контроле концентрации cI -репрессора фага λ . Роше с соавторами показал, что при термации трансляции мРНК cI -репрессора наблюдается конкуренция термации трансляции с участием тмРНК и обычным процессом термации трансляции [10]. Таким образом, тмРНК влияет на выбор между лизогенным и литическим путем развития этого фага. Интересно также отметить, что на С-конце С2 репрессора фага Р22 находится редкий пролиновый кодон. Это говорит о том, что тмРНК может влиять на концентрацию этого белка [12].

ВЛИЯНИЕ тмРНК НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

Делеция гена тмРНК приводит к гибели бактерий от сублетальной концентрации антибиотиков-ингибиторов синтеза белка [11]. К ним относятся антибиотики, уменьшающие точность трансляции, ингибиторы пептидилтрансферазной активности рибосом, ингибиторы транслокации рибосомы и, наконец, ингибиторы, блокирующие туннель для выхода вновь синтезированного

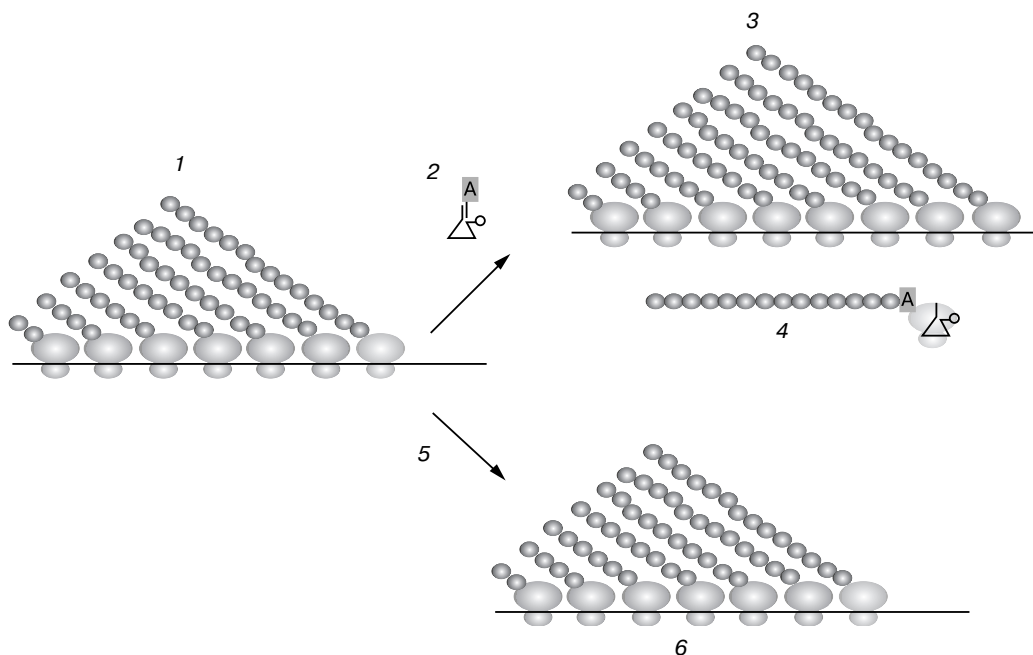


Рис. 5. Модель восстановления трансляции в случае остановки рибосом (модифицировано из [12]):

В случае остановки одной рибосомы в составе полисомы (1) нормальный ход трансляции (3) может быть восстановлен за счет присоединения тмРНК (2); при этом происходит образование «меченого» белка (4), который в дальнейшем деградирует; в случае отсутствия тмРНК (5) рибосомы остаются связанными, и блок трансляции не снимается (6).

белка из рибосомы. Таким образом, тмРНК и молекулы, необходимые для ее работы, являются важными мишенями терапевтического воздействия. Нарушение функционирования этих молекул может позволить уменьшить концентрацию антибиотика, необходимую для лечения.

Влияние тмРНК на устойчивость к антибиотикам, уменьшающим точность трансляции

Представителями таких антибиотиков являются ка-намицин, гентамицин, гигромицин, стрептомицин, G418 и паромомицин. В присутствии этих антибиотиков с высокой частотой происходит «прочтение» стоп-кодона как значащего. Как следствие возрастает число рибосом, которые достигают 3'-конца мРНК и останавливаются в этом положении. Таким образом, если в клетке бактерии присутствует тмРНК, то происходит освобождение таких рибосом (рис. 6). В клетках бактерий мутантных по гену тмРНК освобождение рибосом затруднено, следовательно, они более чувствительны к таким антибиотикам [11].

Влияние тмРНК на устойчивость к антибиотикам, ингибирующим пептидилтрансферазную активность рибосом

Представителями этого типа антибиотиков являются хлорамфеникол и линкомицин. В присутствии этих антибиотиков рибосома останавливается в тот момент, когда А-сайт занят аминоацил-тРНК. Предполагается,

что в данном случае для поступления тмРНК в рибосому, необходимо, чтобы произошло удаление аминоацил-тРНК из А-сайта рибосомы [11] (рис. 6). Кроме того, хлорамфеникол также способен снижать точность трансляции, вызывая прочтение стоп-кодонов как значащих и, как следствие, вызывать остановку рибосомы на 3'-конце мРНК. Таким образом его эффект отчасти можно объяснить как эффект антибиотика, уменьшающего точность трансляции [11].

Влияние тмРНК на устойчивость к антибиотикам, ингибирующим транслокацию рибосом

К таким антибиотикам относятся стрептомицин, тиострептон, фузидовая кислота и спектиномицин. Было показано, что только спектиномицин по-разному влияет на мутантов по гену тмРНК и на бактерий без этой мутации [11]. Спектиномицин блокирует связывание EF-G*ГТФ с рибосомой, а, следовательно, А-сайт рибосомы будет занят пептидил-тРНК. Чтобы объяснить повышенную чувствительность мутантов к этому антибиотику, предположили, что комплекс тмРНК*SmpB*EF-Tu*ГТФ способен проталкивать пептидил-тРНК в Р-сайт без участия EF-G [11] (рис. 6).

Влияние тмРНК на устойчивость к антибиотикам, блокирующим туннель для выхода вновь синтезированного белка из рибосом

Было показано, что мутанты по гену тмРНК более чувствительны к таким антибиотикам, как эритроми-

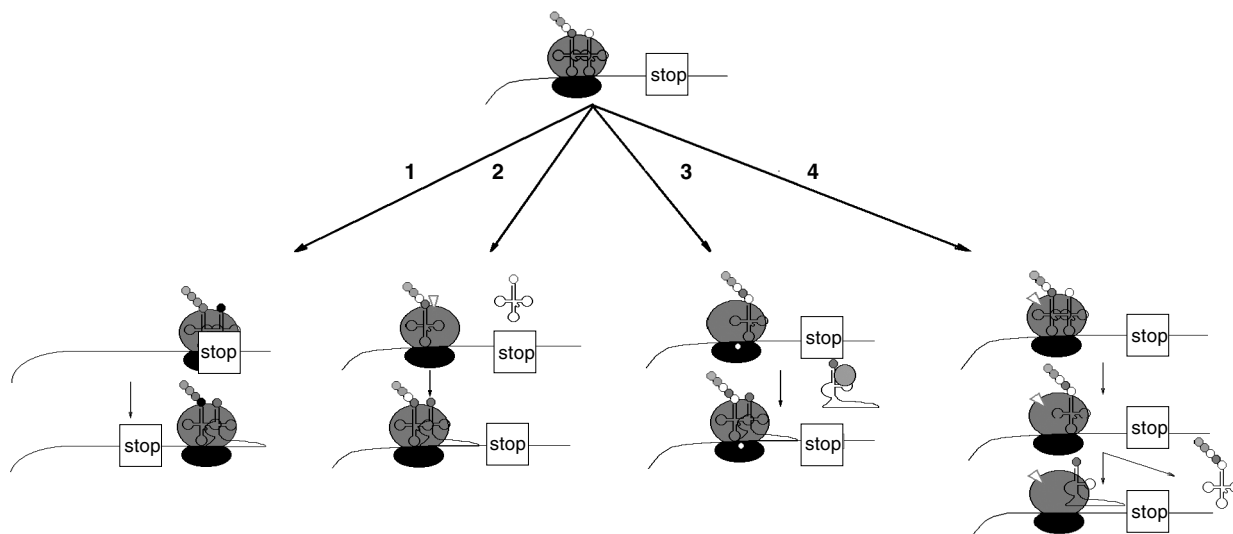


Рис. 6. Воздействие антибиотиков на рибосомы:

Воздействие антибиотиков, уменьшающих точность трансляции, приводит к тому, что рибосома останавливается на 3'-конце транскрипта (1); воздействие антибиотиков, влияющих на пептидилтрансферазную активность, приводит к остановке рибосомы и диссоциации тРНК из А-сайта (2); в случае воздействия антибиотиков, приводящих к утрате способности к транслокации, тмРНК в комплексе с SmpB и EF-Tu*ГТФ способна проталкивать пептидил-тРНК из А-сайта в Р-сайт рибосомы (3); воздействие антибиотиков, блокирующих туннель для выхода пептида из рибосомы приводит к диссоциации пептидил-тРНК (4); пояснения см. в тексте.

цин, спирамицин и тилозин, чем клетки дикого типа. Известно, что эритромицин индуцирует диссоциацию пептидил-тРНК и рибосомы.

Существует предположение, что к рибосоме, от которой отделилась пептидил-тРНК, присоединяется аланил-тмРНК, и начинается трансляция последовательности метки (см. рис. 6). Возможно, что такой способ транс-трансляции облегчается тем, что тмРНК способна образовывать комплекс с аланил-тРНК, а первый кодон внутренней рамки считывания тмРНК представляет собой аланин [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

тмРНК это бактериальная РНК, которая необходима для освобождения остановившихся рибосом. Она состоит из мРНК-подобного и тРНК-подобного доменов, разделенных псевдоузлами. Для функционирования тмРНК необходима аланил-тРНК-синтетаза, белок SmpB и фактор элонгации EF-Tu в комплексе с ГТФ. В результате транс-трансляции, осуществляемой тмРНК, получается белок, несущий сигнальный пептид, синтезированный на матрице открытой рамки считывания тмРНК. Сигнальный пептид распознается и разрушается бактериальными системами протеолиза ClpXP/AP и FtsH в цитоплазме, системой FtsH на мембране и системой Tsp в периплазме.

Было найдено три различных структуры тмРНК, одна из которых является нефункциональной и пред-

ставляет собой рудимент. По всей видимости, основной функцией тмРНК является не удаление потенциально опасных пептидов без С-конца, а освобождение остановившихся рибосом. Эта функция определяет роль тмРНК в регуляции генной экспрессии и в защите бактерии от воздействия ингибиторов белкового синтеза и неблагоприятных условий среды. тмРНК и молекулы, необходимые для ее функционирования являются важными целями терапевтического воздействия.

Работа поддержана грантами CRDF-Минобразование ST-012, РФФИ 03-04-48886, Президиума РАН (программа «Происхождение и эволюция биосферы») № НШ-2214.2004.4.

Литература

1. Gillet R., Felden B. Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue // *Molecular Microbiology*. — 2001. — Vol. 42. — P. 879–885.
2. Haebel P.W., Gutmann S., Ban N. Dial tm for rescue: tmRNA engages ribosomes stalled on defective mRNAs // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2004. — Vol. 14. — P. 58–65.
3. Ibba M., Soll D. Quality control Mechanisms During Translation // *Science*. — 1999. — Vol. 286. — P. 1893–1897.
4. Jeffares D.C., Poole A.M., Penny, D. Relics from the RNA World // *J. Mol. Evol.* — 1998. — Vol. 46. — P. 18–36.
5. Julio S.M., Heithoff D.M., Mahan M.J. ssrA (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium pathogenesis // *J. Bacteriol.* — 2000. — Vol. 182. — P. 1558–1563.
6. Karzai A.W., Roshe E.D., Sauer R.T. The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue // *Nature structural biology*. — 2000. — Vol. 7, N 6 — P. 449–455.

7. Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T. // *Science*. — 1996. — Vol. 271. — P. 990–993.
8. Muto A., Ushida C., Himeno H. // *TIBS*. — 1998. — Vol. 23. — P. 25–29.
9. Poole A.M., Jeffares D.C., Penny D. The Path from the RNA World. // *J. Mol. Evol.* — 1998. — Vol. 46. — P. 1–17.
10. Roshe E.D., Sauer R.T. // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 28509–28515.
11. Vioque A., de la Cruz J. // *FEMS*. — 2003. — Vol. 218. — P. 9–14.
12. Withey J.H., Friedman D.J. The biological roles of trans-translation. // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2002. — Vol. 5. — P. 154–159.
13. Wower J., Wower I.K., Kraal B. *et al.* Quality Control of Elongation Step of Protein Synthesis by tmRNA // *Am. Soc. for Nutritional Sci.* — 2001. — P. 2978S–2982S.

Adaptive role of tmRNA

Zhouravleva G.A., Rovinski N.S.

Department of Genetics and Breeding, Saint-Petersburg State University

✿ **SUMMARY:** tmRNA is a small RNA molecule, found only in bacteria, that exhibits properties of tRNA and mRNA. TmRNA involved in process of «trans-translation» when protein translates from two different RNA molecules and one of them is tmRNA. Its function is decreasing of translation error amount by releasing of stalled ribosomes and degradation of incorrect proteins.

✿ **KEY WORDS:** tmRNA; ribosome; protein synthesis; trans-translation; antibiotic