

РОЛЬ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ РНК В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ РИБОСОМЫ

© 2024 В.Г. Метелев¹, Е.Ф. Баулин^{2#}, А.А. Богданов^{1,3,4*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская область, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: bogdanov@belozersky.msu.ru

⁴ ФГБУН Государственный научный центр РФ Институт биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 21.10.2024

После доработки 21.10.2024

Принята к публикации 04.11.2024

Идентификация и анализ повторяющихся элементов (мотивов) в макромолекулах ДНК, РНК и белков является важным этапом изучения структуры и функций этих биополимеров. В настоящей работе исследовалась функциональная роль NA-BSE (от англ. non-adjacent base-stacking element), широко распространённого мотива в третичной структуре разнообразных РНК, в РНК-РНК-взаимодействиях на различных этапах работы рибосомы в ходе трансляции генетической информации. Описаны мотивы этого типа, обратимо формирующиеся при декодировании мРНК, перемещении субъединиц рибосом друг относительно друга, продвижении мРНК и тРНК по рибосоме в процессе транслокации. Отдельно рассмотрено EF-G-зависимое образование NA-BSE с участием нуклеотидных остатков 5S pРНК и 23S pРНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стэкинг-взаимодействия, третичная структура РНК, рибосомные РНК, A-, P-, E-сайт тРНК, РНК-мотивы.

DOI: 10.31857/S0320972524120086 EDN: IFCGHM

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) выполняют в клетке разнообразные функции: матричные, регуляторные и ферментативные. Функционируя преимущественно в виде комплексов с белками, РНК составляют структурную основу этих комплексов, проявляя при этом ярко выраженную способность к обратимым конформационным превращениям [1, 2]. Ранее в ходе анализа межплоскостных (стэкинг) взаимодействий гетероциклических оснований нуклеотидов, не являющихся соседями в нуклеотидной последовательности самых разнообразных РНК [3, 4], мы показали,

что с их помощью образуется мотив, широко распространённый в третичной структуре РНК. Он был обозначен как NA-BSE (от англ. non-adjacent base-stacking element). Роль этих элементов в образовании и поддержании 3D структур различных РНК была нами недавно достаточно подробно охарактеризована [4]. В настоящей работе рассмотрена роль NA-BSE в функционировании РНК. При этом объектом нашего анализа была рибосомная РНК (pРНК) в составе рибосом (т.е. в комплексе с рибосомными белками, тРНК, мРНК и факторами трансляции), поскольку объём информации о пространственной структуре этих важнейших макромолекулярных комплексов в различных

Принятые сокращения: н.о. – нуклеотидные остатки; BIE – base-intercalated element; NA-BSE – non-adjacent base-stacking element; PDB – Protein Data Bank, банк данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот.

Текущий адрес – Институт молекулярной и клеточной биологии в Варшаве, 02-109 Варшава, Польша.

* Адресат для корреспонденции.

функциональных состояниях в банках структурных данных (прежде всего в RCSB PDB) существенно превышает таковой для всех остальных РНК вместе взятых. Важно также, что доля нуклеотидных остатков (н.о.), образующих NA-BSE, в самих рРНК достаточно велика и приближается к 20% [3, 4].

Конформационные превращения рибосом, происходящие в ходе биосинтеза белка, можно подразделить на две группы: глобальные и локальные. В первом случае малая и большая субъединицы рибосомы на каждом шаге синтеза полипептидной цепи белка совершают обратимое перемещение друг относительно друга. Кроме того, при этом происходит обратимое смещение друг относительно друга крупных доменов, из которых состоят субъединицы рибосомы [5, 6]. Эти глобальные перемещения крупных сегментов рибосомы сопровождаются обратимыми локальными специфическими перестройками как контактов между н.о. в самих рРНК, так и их контактов с тРНК и мРНК. В настоящей работе рассматривается участие NA-BSE в этих структурных превращениях. Предполагается, что подобные структурные превращения лежат в основе механизмов передачи функциональных сигналов как в самой работающей рибосоме, так и в РНК других классов [7, 8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Как и в нашей предыдущей работе [4], мы определили NA-BSE как максимальный набор из k рибонуклеотидов N_1, \dots, N_k , такой, что для каждого $i < k$ основания несмежных остатков N_i и N_{i+1} образуют неканоническое стэкинг-взаимодействие оснований. Для построения набора данных NA-BSE мы использовали данные по структуре рибосом, внесённые в Protein Data Bank (PDB) [9], полученные с разрешением лучше 3,0 Å. Для этого мы отобрали записи, помеченные ключевым словом «LSU» (Large SUbunit) в классах эквивалентности репрезентативного набора RNA3DHub (версия 3.347, разрешение до 3,0 Å) [10]. Выбранный набор включал 677 записей PDB. Для аннотирования NA-BSE использовалась программа DSSR (версия 2.0 [11]), элементы вторичной структуры РНК аннотировали с помощью Python-библиотеки urslib2 [12], а затем NA-BSE аннотировали с помощью пользовательских скриптов Python. Результирующий набор данных включал только NA-BSE из цепей РНК длиной ≥ 25 нуклеотидов, при этом учитывались только стэкинг-взаимодействия оснований, имеющие угол основание-основание $< 30^\circ$ и расстояние между ближайшими атомами двух оснований $< 4,0$ Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базы данных и статистика. Полученная база данных включает в себя 362 543 NA-BSE различных размеров, образованных за счёт стэкинг-взаимодействий между гетероциклическими основаниями 816 186 н.о., не являющимися непосредственными соседями в полинуклеотидных цепях РНК (табл. П1 Приложения). 81,2% (294 342) NA-BSE состоит из двух нуклеотидов, 13,6% (49 281) – из трёх нуклеотидов, 4,2% (15 225) – из четырёх нуклеотидов и 1% включает пять или более остатков (3417 – пять, 273 – шесть, четыре – семь и один NA-BSE – восемь остатков). 58,2% NA-BSE были мотивами, состоящими только из пуринов, 35,3% включали как пурины, так и пиримидины, 5% были образованы пиримидинами и 1,5% NA-BSE включали модифицированные основания. Только 1,3% (4577 из 362 543) NA-BSE включали межмолекулярные взаимодействия (табл. П2 Приложения). NA-BSE типа I, образованные исключительно основаниями одного участка цепи внутри элемента вторичной структуры РНК (стебля или петли), составили 28% набора данных. NA-BSE типа II, образованные разными участками цепи одной и той же петли или стебля, составили почти половину всех мотивов (46,8%), а NA-BSE, включающие дальнодействующие (long-range) взаимодействия между различными элементами вторичной структуры РНК (тип LR), составили 15,9% набора данных. Остальные 9,3% NA-BSE включали смесь различных типов стэкинг-взаимодействий оснований. 6,6% всех NA-BSE включали мотивы, ранее названные нами мотивами BIE (base-intercalated element) и BWE (base-wedged element) [3], причём BIE встречался в четыре раза чаще. Почти все мотивы (98,3%) были дополнительно стабилизированы взаимодействиями между основанием и фосфатом [13]. 24% NA-BSE были стабилизированы взаимодействием одного н.о. с O4'-атомом рибозы другого н.о. [14]. Более половины (56,2%) всех NA-BSE включали канонические (смежные) стэкинг-взаимодействия оснований, образованные фланкирующими остатками с двух сторон, а 35,3% мотивов включали канонический стэкинг оснований, образованный только с одной стороны, без предпочтения какой-либо из сторон. 92,3% всех NA-BSE образовывали канонические (35,6% всех пар оснований) и неканонические (64,4%) пары оснований с другими остатками. Интересно, что 70% неканонических пар оснований находились в транс-ориентации, согласно номенклатуре Леонтиса–Вестхофа [15], однако мы не наблюдали существенного предпочтения ни одной из трёх «граней» оснований («грань» Уотсона–Крика, Хугстена или остатка рибозы) ни среди пар оснований в транс-, ни в цис-положении.

Образование NA-BSE с участием тРНК, мРНК и рРНК в декодирующем центре рибосомы и в процессе транслокации. В ходе процесса транслокации т.н. А-тРНК, поступившая в А-сайт рибосомы в аминоацетилированной форме, после завершения пептидилтрансферазной реакции (ПТР) перемещается из этого сайта в Р-сайт уже в виде пептидил-тРНК. Она замещает в этом сайте деацетилированную Р-тРНК (которая до окончания ПТР несла на себе синтезирующийся пептид), вытесняя её в Е-сайт. При этом находившаяся в Е-сайте деацетилированная тРНК покидает рибосому, а А-тРНК, ранее располагавшаяся в Р-сайте, занимая её место, образует с Е-сайтом несколько специфических тРНК-рРНК-контактов. Этот процесс сопровождается перемещением мРНК в мРНК-связывающем канале малой субъединицы рибосомы строго на один кодон. Отметим, что каждый шаг таких перемещений проходит через одно или несколько промежуточных состояний. Не вдаваясь в детали механизма работы рибосомы как молекулярной машины, подчеркнём ещё раз ключевую роль межнуклеотидных РНК-РНК-взаимодействий во всех этих процессах.

NA-BSE в декодирующем центре рибосомы. Прямое участие рРНК в декодировании генетической информации изучено во многих деталях [16–21]. В частности, убедительно доказано, что основания трёх н.о. рРНК малой субъединицы рибосомы, G530, A1492 и A1493, стабилизируют выбор рибосомой той тРНК, которая соответствует кодону мРНК, находящемуся в А-сайте (здесь и везде в тексте статьи, если специально не оговорено,

указана нумерация нуклеотидов, принятая для рРНК рибосомы *Escherichia coli*) [16]. Это осуществляется с помощью А-минорных взаимодействий этих н.о. с малым желобком кодон-антисенсорной спирали (рис. 1, а). При этом адениновые основания н.о. A1492 и A1493 находятся в стэкинге друг с другом, а положение G530, как следует из анализа, проведённого в этой работе, стабилизировано его включением в NA-BSE, состоящий из трёх нуклеотидов G529–C518–G530 (рис. 1).

Однако в свободной от тРНК рибосоме или в рибосоме, в А-сайте которой отсутствует «правильная» тРНК, A1492 теряет контакт с A1493, переключаясь на образование NA-BSE с аденином н.о. A1913 рРНК большой субъединицы рибосомы (рис. 1, б). Этот вновь образованный NA-BSE становится элементом «моста» между малой и большой субъединицами рибосомы (см. ниже). G530 находится в такой свободной рибосоме в syn-конформации, в то время как при взаимодействии с кодон-антисенсорным комплексом его конформация – anti. Ясно, что при перемещении тРНК из А-сайта в Р-сайт, т.е. при разрушении одного кодон-антисенсорного комплекса и в преддверии образования нового, исходная структура двух рассмотренных выше NA-BSE должна восстанавливаться. Таким образом, приведённые здесь данные отчётливо демонстрируют способность анализируемых в этой работе мотивов разрушаться и образовываться вновь (флуктуировать) в ответ на изменение функционального состояния рибосомы.

Другое важное наблюдение, которое следует из анализа приведённых выше данных, заклю-

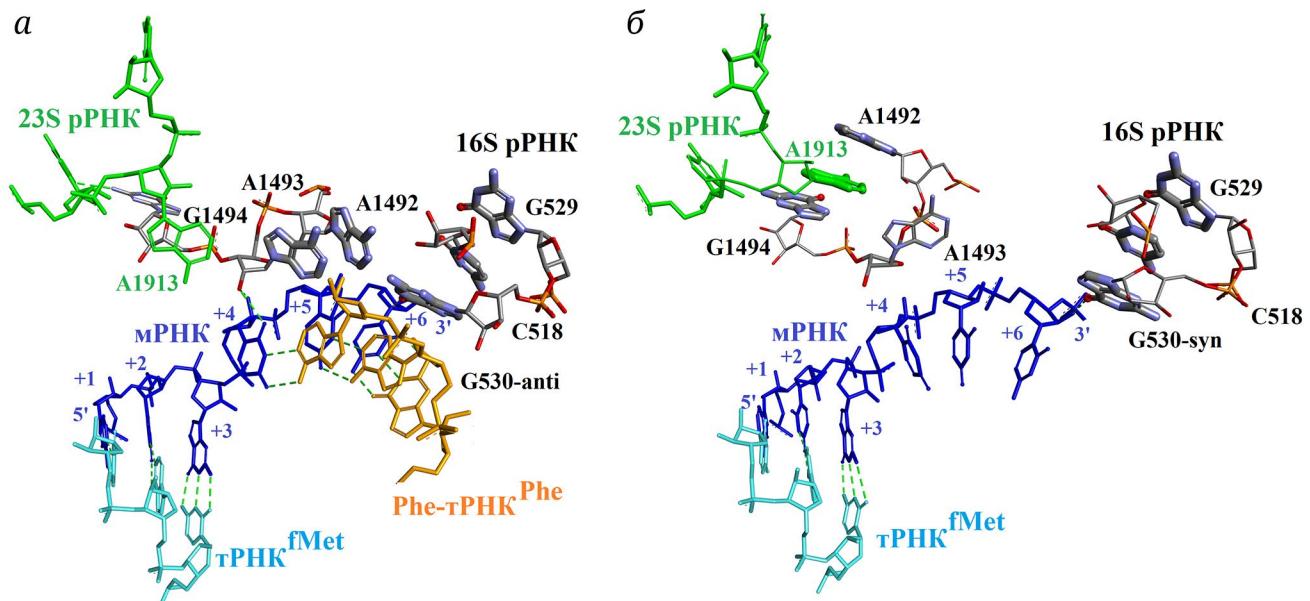


Рис. 1. Образование NA-BSE в декодирующем центре рибосомы *E. coli*. *а* – В кодон-антисенсорные взаимодействия вовлечены как А-, так и Р-сайты рибосомы (PDB ID: 5UYM); *б* – А-сайт рибосомы свободен (PDB ID: 5UYK) (подробности – в тексте). Построение пространственных структур РНК, их анализ и создание всех иллюстраций было осуществлено с помощью программы Discovery Studio Visualizer v.21.1.0.20298

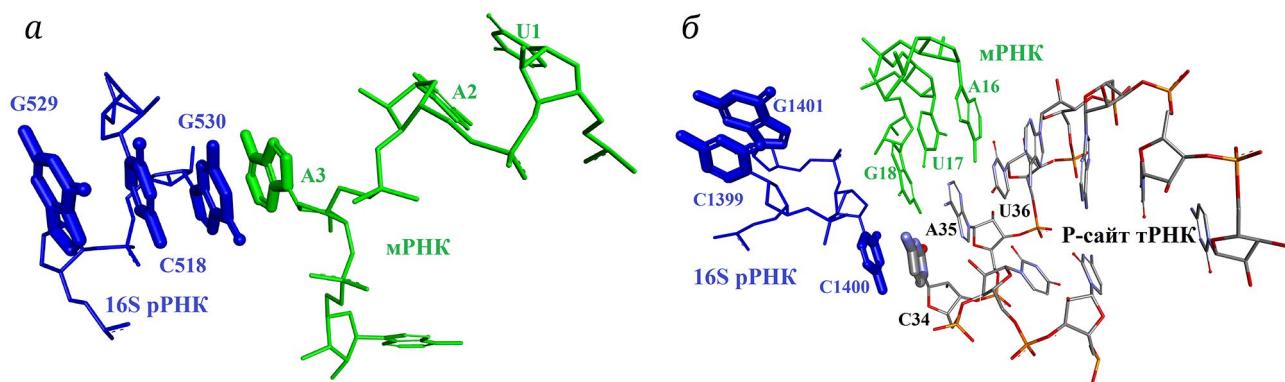


Рис. 2. Образование стопкообразного NA-BSE с участием G530 16S pРНК и A3 стоп-кодона мРНК, расположенного в A-сайте рибосомы (PDB ID: 4V67, *а*). Универсальный способ фиксации тРНК в P-сайте рибосомы путём образования NA-BSE из C34 тРНК и C1400 16S pРНК, экспонированного из её полинуклеотидной цепи вследствие образования NA-BSE C1399–G1401 (PDB ID: 7K00, *б*)

чается в том, что гетероциклическое основание в NA-BSE (в данном случае гуанин в G530) способно совершить поворот вокруг гликозидной связи фактически на 180° и вновь образовать стэкинг-контакт со своим прежним соседом (ср. конформации G530 на рис. 1, *а* и *б*).

Более того, было показано [22, 23], что когда в A-сайте рибосомы находится стоп-кодон, т.е. наступает стадия терминации трансляции, G530 вступает в стэкинг-взаимодействие с н.о. A3 этого кодона и образует с ним NA-BSE. Это, в свою очередь, приводит к временному образованию «стопки», состоящей из четырёх нуклеотидов (и, соответственно, из трёх NA-BSE), характеризующейся сильным перекрыванием плоскостей гетероциклических оснований (рис. 2, *а*).

Таким образом, здесь происходит фиксация мРНК, которая продолжается до тех пор, пока не произойдут все события, составляющие процесс терминации трансляции.

И, наконец, ещё один консервативный NA-BSE, функция которого состоит в стабилизации кодон-антикодоновых взаимодействий, образуется с помощью стэкинг-контакта между C1400 pРНК малой субъединицы рибосомы и 5'-концевого нуклеотида в антисензе P-тРНК (например, как это показано на рис. 2, *б*, с C34 формилметиониновой тРНК *E. coli*) [24]. Необходимо заметить, что для того, чтобы этот контакт мог реализоваться, н.о. C1400 должен быть вытеснен из полинуклеотидной цепи 16S pРНК нуклеотидами C1399 и G1401, в свою очередь, также образующими NA-BSE [24] (рис. 2, *б*).

Контакты pРНК с мРНК вне декодирующего центра рибосомы, образованные NA-BSE. Ранее при анализе структурных мотивов в РНК, обозначенных нами как BIE и BWE [3], которые входят в рассматриваемое здесь более обширное семейство NA-BSE [4], мы описали мотив, образуемый н.о. A1503 pРНК малой субъединицы рибосомы

с н.о. -1 и -2 мРНК. Он был обнаружен более десяти лет назад Noller et al. [25]. Авторы высказали предположение о том, что этот контакт необходим для поддержания правильной рамки считывания мРНК рибосомой в процессе транслокации. Недавно в той же лаборатории удалось получить убедительное доказательство этой гипотезы: в мутантных рибосомах *E. coli*, в 16S pРНК которых отсутствовало адениновое (и какое-либо другое) основание в положении 1503, сдвиг рамки считывания мРНК наблюдался примерно вдвое чаще, чем в рибосомах дикого типа [26]. Было показано также, что точное расположение сайта связывания остатка A1503 16S pРНК с мРНК зависит от функционального состояния рибосомы (ср., например, файлы с PDB ID: 4V9K и 4V8D).

По-видимому, аналогичную роль выполняют в процессе транслокации NA-BSE, образуемые нуклеотидами мРНК и консервативными н.о. C1397, U1196 и G926 pРНК малых субъединиц рибосом, приведёнными в табл. П2.

NA-BSE в составе «мостиков», соединяющих малую и большую субъединицы рибосомы. Известно, что субъединицы рибосомы связаны друг с другом при помощи т.н. «мостов», которые образуются за счёт белок-белковых, РНК-белковых и РНК-РНК-взаимодействий. Количество таких «мостов» варьирует от 12 до 17 у рибосом различных организмов (для обзора см. работу Liu и Fredrick [27]). Межсубъединичные контакты, образуемые в «мостиках» только н.о. pРНК, поддерживаются в большинстве случаев связями между 2'-гидроксилом рибозы и фосфатными группами (с участием ионов магния), а также с помощью А-минорных мотивов. Однако в двух случаях ключевую роль в образовании таких «мостов» играют NE-BSE.

Межсубъединичный контакт A1492-A1913, образующийся, когда A-сайт рибосомы свободен, рассмотрен нами выше (рис. 1, *б*). Он обозначается

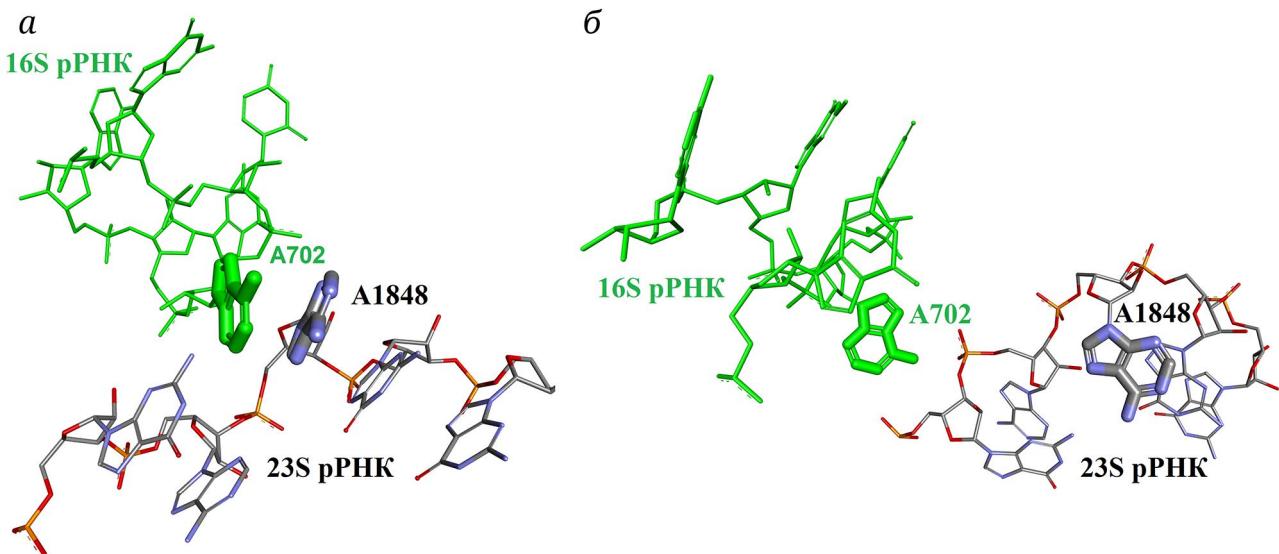


Рис. 3. Образование (PDB ID: 7SS9, а) и разрушение (PDB ID: 7SSL, б) «моста» B7 между субъединицами рибосомы *E. coli*

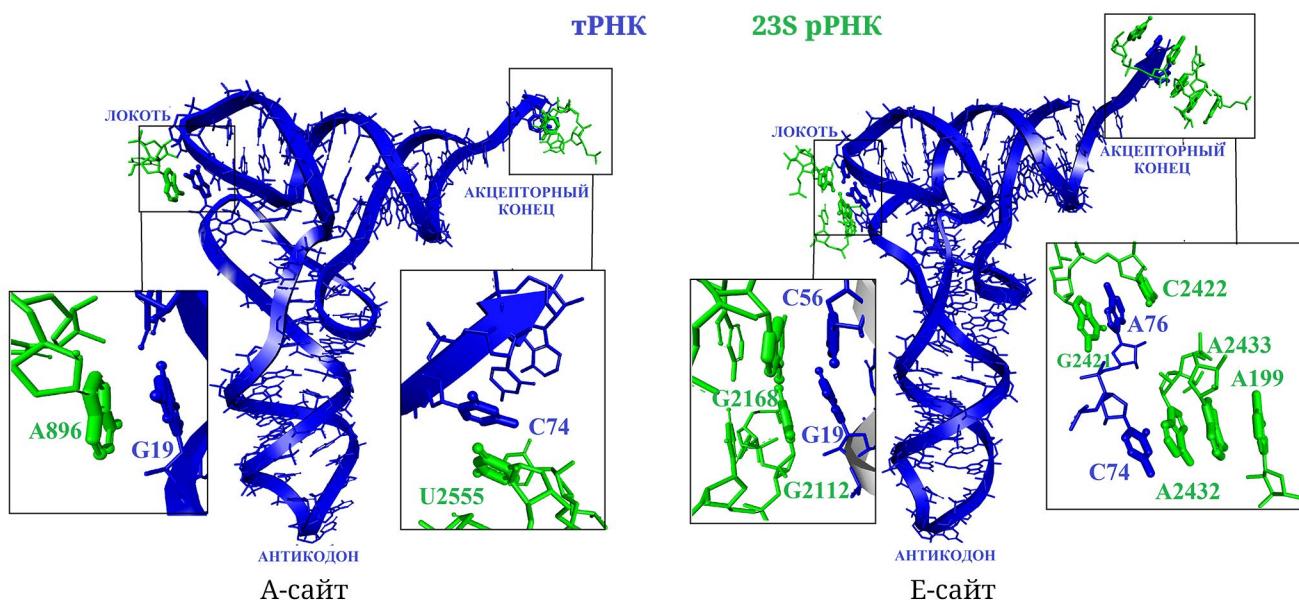


Рис. 4. NA-BSE, образующиеся в процессе транслокации тРНК по её А- и Е-сайтах

как «мост» B2a/d. Ярко выраженная относительная подвижность образующих его остатков адениловых кислот особенно отчетливо демонстрирует зависимость образования таких «мостов» от функционального состояния рибосомы.

Как показывает анализ данных, суммированных в табл. П2, второй «мост», обозначаемый как B7 и построенный из NA-BSE A702–A1848, сохраняется в процессе транслокации и в большинстве промежуточных функциональных состояний рибосомы и разрушается лишь тогда, когда величина угла поворота субъединиц друг относительно друга достигает максимальной величины (ср., например, относительное расположение этих

нуклеотидов в структурах с PDB ID: 7SS9 и 7SSL (рис. 3)).

Роль NA-BSE в организации контактов между тРНК и рРНК большой субъединицы рибосомы. Здесь мы рассмотрим NA-BSE, которые временно возникают за счёт стэкинг-контактов нуклеотидных оснований рРНК и тРНК в ходе перемещения последней из одного сайта рибосомы в другой, т.е. в процессе транслокации. тРНК в двух из трёх основных состояний, А и Е, сопровождающих её перемещение по рибосоме, показана на рис. 4.

NA-BSE, возникающий в Р-сайте тРНК-рибосомного комплекса, мы рассмотрели выше (рис. 2, б).

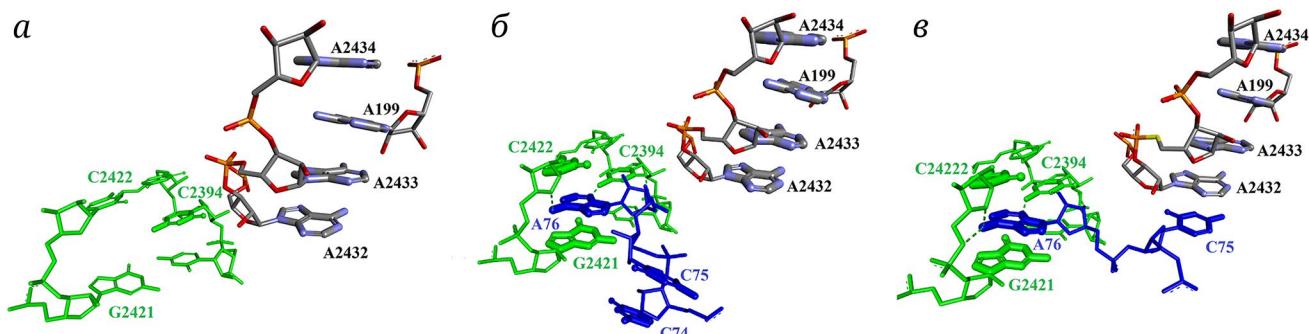


Рис. 5. NA-BSE, образующиеся при связывании 3'-конца деацетилированной тРНК с Е-сайтом рибосомы *E. coli*. а – «карман» для связывания акцепторного конца тРНК в вакантной рибосоме (PDB ID: 6PJ6); б – NA-BSE G2421-A76-C2422, деацетилированная тРНК находится в рибосоме в промежуточном Р/Е-состоянии (PDB ID: 8SYL); в – образование плоской конформации C75-A76 и стопкообразного NA-BSE с участием остатка C75 тРНК перед диссоциацией тРНК из рибосомы (PDB ID: 7K00)

Оказалось, что как в А-, так и в Е-сайте такие мотивы образуются с участием двух важных функциональных элементов тРНК: т.н. «локтя» и 3'-концевой акцепторной области. В макромолекуле тРНК элемент её 3D структуры, называемый «локтем», формируется за счёт ряда специфических межнуклеотидных взаимодействий Т- и D-петлевых однолепочечных участков. Как мы показали ранее [3], NA-BSE также участвуют в формировании этого функционального центра тРНК. При этом плоскости двух гетероциклических оснований (в большинстве случаев G19 и C56) оказываются сближенными и экспонироваными в раствор. Они задействованы практически во всех РНК-белковых и РНК-РНК-комплексах, которые можно наблюдать в процессе функционирования тРНК в клетке [28].

Когда тРНК находится в А-сайте рибосомы, одно из этих оснований, а именно G19, образует стэкинг-контакт с A896 рРНК большой субъединицы рибосомы [19] (рис. 4).

Кроме того, в большинстве функциональных комплексов рибосомы н.о. C74 тРНК, расположенный по соседству с её 3'-акцепторным концом, образует NA-BSE с U2555 рРНК большой субъединицы рибосомы (рис. 4). Нуклеотид U2555 входит в состав т.н. А-петли этой рРНК – одного из компонентов пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосомы. Его замена на пуриновые нуклеотиды оказывается на точности работы рибосомы [29]. В то же время мутация U2555C приводит к повышению термостабильности рибосом *E. coli* [30].

При перемещении пептидил-тРНК из А-сайта в Р-сайт оба NA-BSE разрушаются. При этом «локтёй» тРНК в новых РНК-РНК-взаимодействиях не участвует (он взаимодействует главным образом с белком L5), а тРНК и рРНК образуют лишь рассмотренный нами ранее NA-BSE C34-C1400 (см. рис. 2, б).

Транслокация тРНК из Р-сайта в Е-сайт (происходящая, как мы уже отмечали, после завершения

ПТР) сопровождается образованием наибольшего числа NA-BSE. Во-первых, в промежуточном состоянии этого перехода, когда кодон-антикодоновый комплекс в Р-сайте ещё сохраняется, адениновое основание 3'-концевого остатка тРНК (в большинстве тРНК это A76) размещается в специальном «кармане» с образованием, по сути дела, двойного NA-BSE. При этом A76 не интеркалирует между основаниями соседних н.о. рРНК (как в случае В1Е), а размещается в «кармане» (полости), который уже существует в рибосоме (рис. 5).

Его можно обнаружить и в вакантной, не связанный с тРНК и не функционирующей рибосоме, выделенной из любого организма, а также из митохондрий и хлоропластов (рис. 5, а). Положение остатков G2421 и C2422 (непосредственных соседей в нуклеотидной последовательности рРНК, с основаниями каждого из которых аденин в A76 находится в стэкинге) в её 3D структуре стабилизировано образованием уотсон-криковской пары G2421-C2395 и неканонической пары C2422-U2393 соответственно. Между этими парами в противоположной цепи рРНК находится н.о. C2394. Положение A76, кроме стэкинг-взаимодействий, стабилизировано тремя полноценными Н-связями с основанием C2394 и сахаро-фосфатным оставом, также формирующими «карман» (рис. 5, б, в). Интересно, что образование этого NA-BSE можно наблюдать не только в случае полноразмерной тРНК, но и используя сравнительно короткий «акцепторный» фрагмент тРНК [31].

На следующем промежуточном этапе перемещения деацетилированной тРНК из Р- в Е-сайт в игру вступает ещё один важный РНК-белковый домен большой субъединицы рибосомы, т.н. «L1-выступ», в организации которого белок L1 играет ключевую роль [32]. Первоначально NA-BSE образуется за счёт стэкинг-взаимодействия G19 тРНК с G2112 23S рРНК (рис. 6, а; PDB ID: 7ST6).

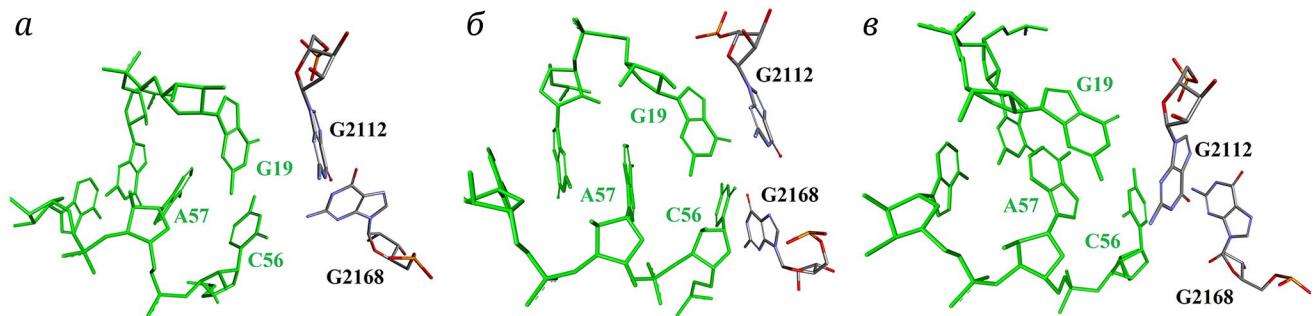


Рис. 6. Относительное расположение остатков G19 и C56 «локтя» тРНК и G2112 и G2168 «L1-выступа» 23S рРНК, *а* – на начальном этапе перемещения тРНК из Р-сайта в Е-сайт рибосомы (PDB ID: 7ST6); *б* – при полном перемещении тРНК в Е-сайт (PDB ID: 7SSN); *в* – на начальном этапе диссоциации тРНК из Е-сайта (PDB ID: 7ST2)

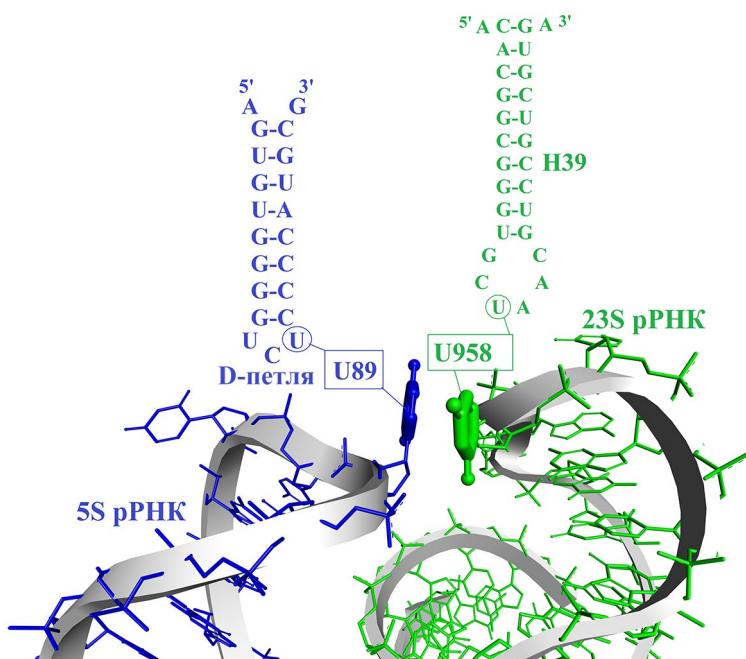


Рис. 7. NA-BSE, образованный нуклеотидными остатками D-петли 5S pРНК и т.н. «петли 960», замыкающей спираль H39 23S pРНК в рибосоме *E. coli* (PDB ID: 5MDV)

Когда же тРНК полностью переходит в Е-сайт, она закрепляется в нем ещё одним NA-BSE, образуемым остатками C56 тРНК и G2168 рРНК (рис. 6, б; PDB ID: 7SSN). И, наконец, эти контакты «локтя» с «L1-выступом» разрушаются перед тем, как тРНК покинет рибосому (рис. 6, в; PDB ID: 7ST2).

Что же касается акцепторного конца тРНК, то в случае рибосом эубактерий в районе «кармана» большой субъединицы образуется NA-BSE из остатков C75 тРНК и A2432 рРНК, который, в свою очередь, является фланкирующим нуклеотидом стопкообразного NA-BSE A2433–A199–A2434. Этот последний мотив выполняет в рибосоме роль соединяющего звена между сильно удалёнными друг от друга элементами вторичной структуры рРНК. При этом н.о. A76 и C75 тРНК, расположенной в Е-сайте рибосом бактерий, образуют весьма необычную структуру, в которой гетеро-

циклические основания лежат в одной плоскости (рис. 5, б). Интересно, что контакт акцепторного конца тРНК с 23S рРНК, образованный двумя NA-BSE, оказывается настолько прочным, что её плоская 3'-концевая структура сохраняется, когда вся остальная часть макромолекулы тРНК покидает рибосому [24] (рис. 5, в).

Заметим, что образование стэкинг-контакта между C75 и A2432 и, соответственно, плоской структуры C75–A76 в рибосомах архей, а также в цитоплазматических и митохондриальных рибосомах эукариот невозможно вследствие стерических препятствий, создаваемых одним из белков, расположенных в этом районе рибосомы.

Взаимодействие D-петли 5S pРНК с рРНК большой субъединицы рибосомы. Среди мотивов, временно возникающих в процессе транслокации, мы хотели бы более подробно рассмотреть

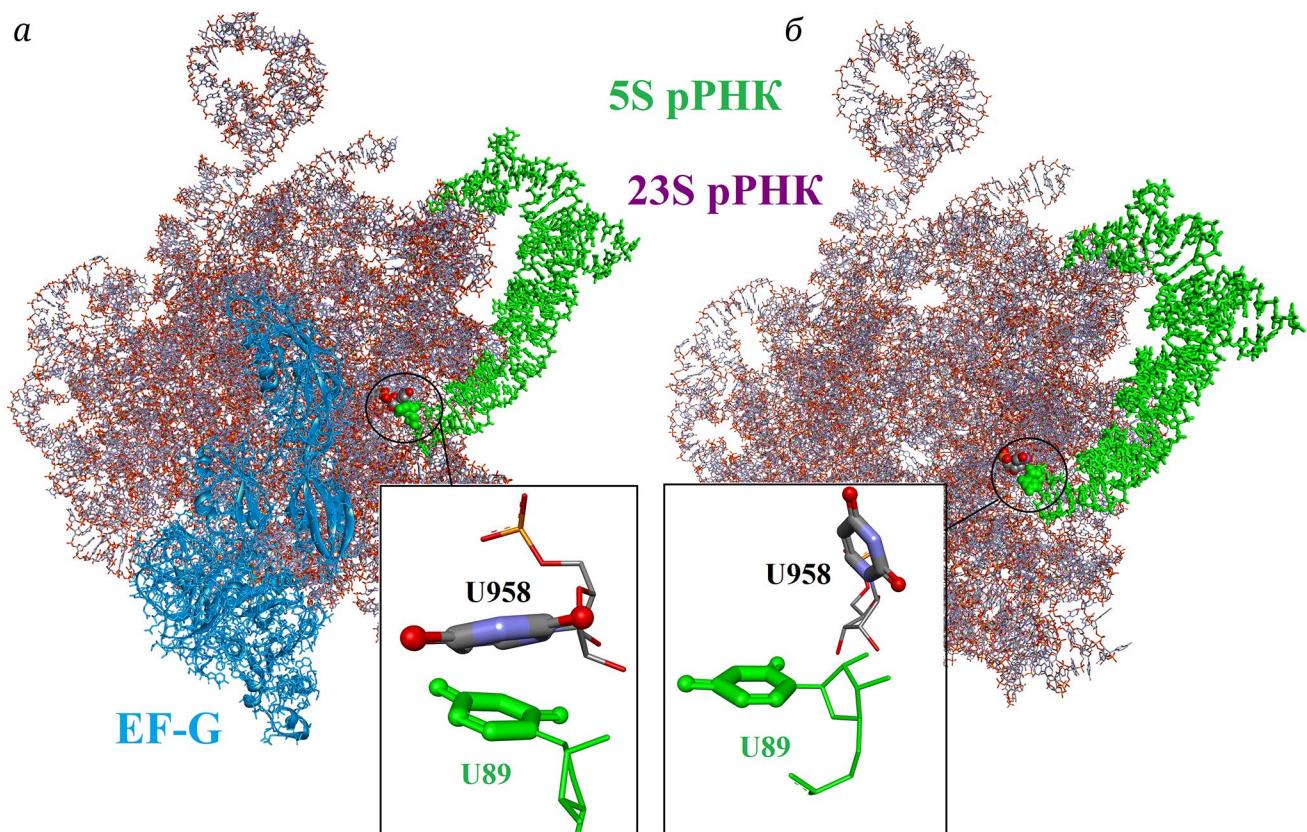


Рис. 8. Взаимное расположение нуклеотидных остатков U89 тРНК и U958 23S pРНК, *а* – в присутствии (PDB ID: 7SSL) и *б* – в отсутствии (PDB ID: 7SSW) элонгационного фактора EF-G в рибосоме *E. coli*

NA-BSE, образующийся в ряде третичных структур рибосом *E. coli* (табл. П2) из н.о. U89 D-петли 5S pРНК и U958 «петли 960» 23S pРНК (рис. 7).

Возможность для его образования открываеться благодаря наличию в макромолекуле 5S pРНК этих рибосом другого, но уже постоянного NA-BSE, состоящего из G86 и C88, стэкинг-взаимодействие оснований которых приводит к экспонированию из D-петли двух остатков уридиновой кислоты – U87 и U89.

Наличие непосредственного контакта двух остатков уридиновой кислоты, показанных на рис. 8, хорошо согласуется с полученными ранее экспериментальными данными. Во-первых, рассматриваемые здесь одноцепочечные участки двух разных pРНК в рибосоме *E. coli* могут быть ковалентно связаны реагентами, избирательно сшивающими основания рядом расположенных н.о. РНК [33]. Во-вторых, мутации в «петле 960» 23S pРНК приводят к изменению реакционной способности соседнего с U89 остатка C90 D-петли 5S pРНК [34].

Почему же этот мотив представляет особый интерес? Известно, что 5S pРНК является обязательным компонентом цитоплазматических рибосом всех про- и эукариот. Рибосомы этих классов полностью лишены способности синтезировать

белки, если 5S pРНК-белковый комплекс в них по каким-то причинам отсутствует. Сегодня, когда доступными стали сотни 3D структур 5S pРНК в составе рибосом, полученные с атомным или близким к атомному разрешением, проблему пространственной структуры 5S pРНК можно считать полностью решённой. В то же время ответ на вопрос о функциональной роли 5S pРНК в рибосоме остаётся открытым.

В литературе были высказаны две не противоречащие друг другу гипотезы, согласно которым, во-первых, 5S pРНК и специфичные к ней рибосомные белки выполняют роль сигнал-передающего звена между GTPазным центром и ПТЦ рибосомы [33–36] и, во-вторых, 5S pРНК обеспечивают правильную сборку больших субъединиц рибосом в процессе их биогенеза [37–39]. Ясно, что для проверки любой из этих гипотез, а также для дальнейшего выяснения деталей механизма функционирования 5S pРНК в рибосоме необходима надёжная информация о её контактах с другими РНК рибосомного комплекса. С другой стороны, в большинстве доступных на сегодня третичных структур 70S рибосом *E. coli* н.о. U89 D-петли 5S pРНК и U985 «петли 960» 23S pРНК стэкинг-структур не образуют, хотя они и расположены вблизи друг от друга.

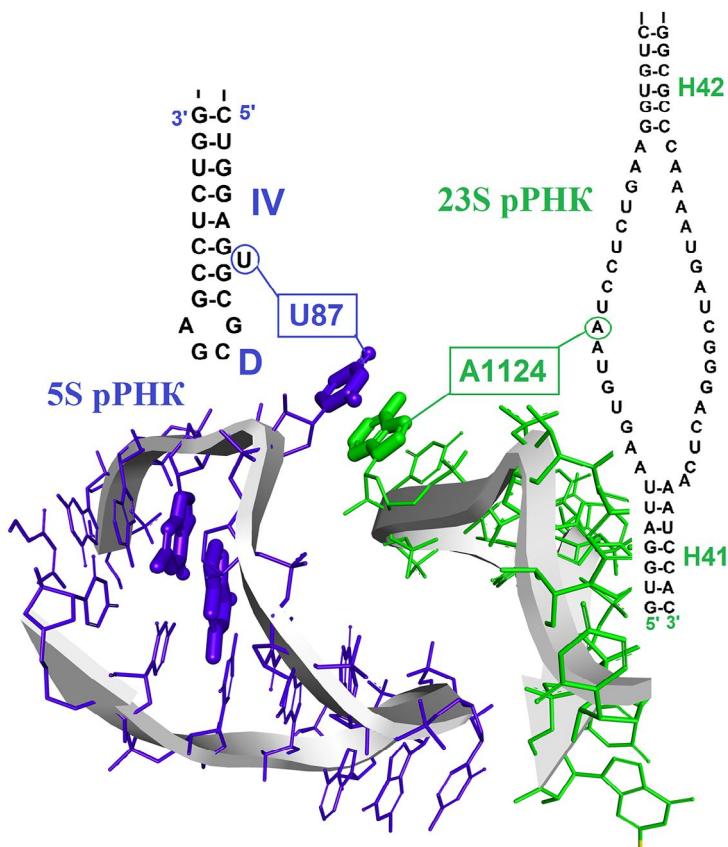


Рис. 9. Контакт в виде NA-BSE примыкающей к D-петле двойной спирали IV 5S pPHK и н.о. A1124 двойной петли 23S pPHK рибосом *Haloarcula marismortui*

Возникает естественное предположение о том, что D-петля 5S pPHK и «петля 960» 23S pPHK в рибосомах бактерий только временно контактируют друг с другом посредством NA-BSE, подобно многим другим рассмотренным нами выше мотивам этого типа, несущим функциональную нагрузку. При этом такой контакт существует лишь в определённом функциональном состоянии рибосомы. Это предположение достаточно убедительно подтверждается примером, показанным на рис. 8 [40]: в рибосоме, которая в процессе транслокации связана с EF-G (рис. 8, а), образуется NA-BSE U89–U985. Этот мотив разрушается после того, как фактор элонгации покидает рибосому (рис. 8, б).

И действительно, в базах данных, которые мы использовали в настоящей работе (табл. П1 и П2), NA-BSE U89–U985 наблюдаются только в комплексах рибосомы с факторами трансляции. Как правило, положение EF-G на рибосоме в них было «заморожено» ингибиторами GTPазной активности фактора с помощью GMP-PCP или фусидовой кислоты (см., например, структуры с PDB ID: 4V9O и 5MDV). Как видно из рис. 8, прямой контакт между фактором элонгации EF-G и 5S pPHK в рибосоме отсутствует. Таким образом, EF-G катализирует образование NA-BSE U89–U985 аллостерически.

Что же касается NA-BSE, образование которого показано на рис. 7, то он формируется на рибосоме *E. coli* в присутствии фактора терминации трансляции RF2, который также является GTPазой (PDB ID: 5MDV).

Отметим, что экспонированные остатки уридиновой кислоты спирали IV, расположенные рядом с D-петлёй 5S pPHK рибосом некоторых архей, а также всех низших и высших эукариот (сведения о которых содержатся в базе данных П1) образуют постоянные NA-BSE-контакты с одним из остатков аденина большой петли, соединяющей спирали H41 и H42 pPHK большой субъединицы рибосом так, как это показано на примере рибосом *Haloarcula marismortui* (рис. 9).

К сожалению, для рибосом этих организмов в литературе нет данных, которые позволили бы сравнить взаимное расположение этих нуклеотидов в присутствии или отсутствии белковых факторов трансляции, обладающих GTPазной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы рассмотрели сравнительно небольшую группу NA-BSE, весьма

распространённого мотива в 3D структуре РНК. В этой группе представлены мотивы, которые образуются в процессе функционирования рибосомы на всех этапах синтеза полипептидной цепи белков (за исключением мотивов, расположенных в ПТЦ рибосомы, которые были рассмотрены нами ранее [3]). Эту группу составляют лишь менее 1% NA-BSE, участвующих в формировании третичной структуры рРНК (ср. табл. П1 и П2). Особенность этих мотивов состоит в том, что они образуются временно на определённом этапе функционирования рибосомы и диссоциируют при переходе к следующему этапу. Можно думать, что сигналами диссоциации служат ещё недостаточно изученные факторы, управляющие работой рибосомы как молекулярной машины. Ряд н.о. и их комбинаций, из которых состоят функциональные NA-BSE (например, н.о. D- и T-петель тРНК, формирующие их «локти»), весьма консервативны и у всех организмов состоят из одних и тех же гетероциклических оснований. В других случаях консервативность проявляется на уровне сохранения пуриновых и пиримидиновых оснований в соответствующих позициях. В третьих случаях (как, например, в 5'-положении «кармана», предназначенного для связывания 3'-концевого нуклеотида акцепторного конца тРНК в Е-сайте рибосомы) консервативность отсутствует. Однако для формирования полноценного NA-BSE взаимная ориентация н.о., из которых он собирается, должна быть строго

заданной. Это достигается как стэкинг-взаимодействием н.о. мотива с основаниями фланкирующих н.о., так и спариванием с находящимися по соседству комплементарными основаниями.

Нет сомнений в том, что расширение наших знаний о процессах образования и распада NA-BSE в РНК и их комплексов с белками будет способствовать более глубокому пониманию механизма функционирования этих ключевых для жизни клетки макромолекул.

Вклад авторов. В.М. проанализировал данные и подготовил все рисунки. Е.Б. выполнил вычислительную работу и конформационный анализ. А.Б. разработал проект. Все авторы внесли значительный вклад в написание рукописи.

Благодарности. Авторы благодарят рецензентов за внимательное прочтение рукописи и конструктивные предложения.

Финансирование. Статья выполнена в рамках работ по теме № 121031300037-7 госзадания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ganser, L. R., Kelly, M. L., Herschlag, D., and Al-Hashimi, H. M. (2019) The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 474-489, <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0136-0>.
2. Wu, M. T., and D'Souza, V. (2020) Alternate RNA structures, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **12**, a032425, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032425>.
3. Baulin, E., Metelev, V., and Bogdanov, A. (2020) Base-intercalated and base-wedged stacking elements in 3D-structure of RNA and RNA-protein complexes, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 8675-8685, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa610>.
4. Метелев В. Г., Баулин Е. Ф., Богданов А. А. (2023) Множественные неканонические стэкинг-взаимодействия гетероциклических оснований как один из главных факторов организации третичной структуры, *Биохимия*, **88**, 975-985, <https://doi.org/10.31857/S0320972523060076>.
5. Spirin, A. S. (1985) Ribosomal translocation: facts and models, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **32**, 75-114, [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60346-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60346-3).
6. Noller, H. F., Lancaster, L., Mohan, S., and Zhou, J. (2017) Ribosome structural dynamics in translocation: yet another functional role for ribosomal RNA, *Quart. Rev. Biophys.*, **50**, e12, <https://doi.org/10.1017/S0033583517000117>.
7. Sweeney, B. A., Roy, P., and Leontis, N. B. (2015) An introduction to recurrent nucleotide interactions in RNA, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **6**, 17-45, <https://doi.org/10.1002/wrna.1258>.
8. Korostelev, A. A. (2022) The structural dynamics of translation, *Annu. Rev. Biochem.*, **91**, 245-267, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-071921-122857>.
9. Kouranov, A., Xie, L., de la Cruz, J., Chen, L., Westbrook, J., Bourne, P. E., and Berman, H. M. (2006) The RCSB PDB information portal for structural genomics, *Nucleic Acids Res.*, **34**, D302-D305, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj120>.
10. Leontis, N., and Westhof, E. (2012) RNA 3D structure analysis and prediction, in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, https://doi.org/10.1007/978-3-642-25740-7_13.

11. Lu, X.-Jun, Bussemaker, H. J., and Olson, W. K. (2015). DSSR: an integrated software tool for dissecting the spatial structure of RNA, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e142, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv716>.
12. Bohdan, D. R., Voronina, V. V., Bujnicki, J. M., and Baulin, E. F. (2023) A comprehensive survey of long-range tertiary interactions and motifs in non-coding RNA structures, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 8367-8382, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad605>.
13. Zirbel, C. L., Sponer, J. E., Sponer, J., Stombaugh, J., and Leontis, N. B. (2009) Classification and energetics of the base-phosphate interactions in RNA, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4898-4918, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp468>.
14. Chawla, M., Chermak, E., Zhang, Q., Bujnicki, J. M., Oliva, R., and Cavallo, L. (2017) Occurrence and stability of lone pair- π stacking interactions between ribose and nucleobases in functional RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11019-11032, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx757>.
15. Leontis, N. B., and Westhof, E. (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs, *RNA*, **7**, 499-502, <https://doi.org/10.1017/S1355838201002515>.
16. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, **292**, 897-902, <https://doi.org/10.1126/science.1060612>.
17. Ogle, J. M., and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translation fidelity, *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 129-177, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.061903.155440>.
18. Abdi, N. M., and Frederick, K. (2005) Contribution of 16S rRNA nucleotides forming the 30S subunit A and P sites to translation in *Escherichia coli*, *RNA*, **11**, 1624-1632, <https://doi.org/10.1261/rna.2118105>.
19. Jenner, L., Demeshkina, N., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1072-1078, <https://doi.org/10.1038/nsmb.1880>.
20. Loveland, A. B., Demo, G., Grigorjeff, N., and Korostelev, A. A. (2017) Ensemble cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity, *Nature*, **546**, 113-117, <https://doi.org/10.1038/nature22397>.
21. Rodnina, M. V., Fischer, N., Maracci, C., and Stark, H. (2017) Ribosome dynamics during decoding, *Phil. Trans. R. Soc.*, **372**, 20160182, <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0182>.
22. Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Scott, W. G., and Noller, H. F. (2008) Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19684-19689, <https://doi.org/10.1073/pnas.0810953105>.
23. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S., and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes, *Nature*, **524**, 493-496, <https://doi.org/10.1038/nature14896>.
24. Watson, Z. L., Ward, F. R., Méheust, R., Ad, O., Schepartz, A., Banfield, J. F., and Cate, J. H. (2020) Structure of the bacterial ribosome at 2 Å resolution, *Elife*, **9**, e60482, <https://doi.org/10.7554/elife.60482>.
25. Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J. P., and Noller, H. F. (2013) Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation, *Science*, **340**, 1236086, <https://doi.org/10.1126/science.1236086>.
26. Smart, A., Lancaster, L., Donohue, J. P., Niblett, D., and Noller, H. F. (2024) Implication of nucleotides near the 3' end of 16S rRNA in guarding the translational reading frame, *Nucleic Acids Res.*, **52**, 5950-5958, <https://doi.org/10.1093/nar/gkae143>.
27. Liu, Q., and Fredrick, K. (2016) Intersubunit bridges of the bacterial ribosome, *J. Mol. Biol.*, **428**, 2146-2164, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.009>.
28. Zhang, J., and Ferré-D'Amaré, A. R. (2016) The tRNA elbow in structure, recognition and evolution, *Life*, **6**, 3, <https://doi.org/10.3390/life6010003>.
29. O'Connor, M., and Dahlberg, A. E. (1993) Mutations at U2555, a tRNA-protected base in 23S rRNA, affect translational fidelity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9214-9218, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9214>.
30. Nissley, A. J., Penev, P. I., Watson, Z. L., Banfield, J. F., and Cate, J. H. D. (2023) Rare ribosomal RNA sequences from archaea stabilize the bacterial ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 1880-1894, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1273>.
31. Schmeing, T. M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2003) Structures of deacylated tRNA mimics bound to the E site of the large ribosomal subunit, *RNA*, **9**, 1345-1352, <https://doi.org/10.1261/rna.5120503>.
32. Mohan, S., and Noller, H. F. (2017) Recurring RNA structural motifs underlie the mechanics of L1 stalk movement, *Nat. Commun.*, **8**, 14285, <https://doi.org/10.1038/ncomms14285>.
33. Dontsova, O., Tishkov, V., Dokudovskaya, S., Bogdanov, A., Doering, T., Rinke-Appel, J., Thamm, S., Greuer, B., and Brimacombe, R. (1994) Stem-loop IV of 5S rRNA lies close to the peptidyltransferase center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4125-4129, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4125>.
34. Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., Dahlberg, A. E., and Dontsova, O. A. (2000) Mutations at position A960 of *E. coli* 23S ribosomal RNA influence the structure of 5S ribosomal RNA and the peptidyltransferase region of 23S ribosomal RNA, *J. Mol. Biol.*, **299**, 379-389, <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3739>.

35. Smith, M. W., Meskauskas, A., Wang, P., Sergiev, P. V., and Dinman, J. D. (2001) Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.*, **21**, 8264-8275, <https://doi.org/10.1128/MCB.21.24.8264-8275.2001>.
36. Kouvela, E. C., Gerbanas, G. V., Xaplanteri, M. A., Petropoulos, A. D., Dinos, G. P., and Kalpaxis, D. L. (2007) Changes in the conformation of 5S rRNA cause alterations in principal functions of the ribosomal nanomachine, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5108-5119, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm546>.
37. Huang, S., Aleksashin, N. A., Loveland, A. B., Klepacki, D., Reier, K., Kefi, A., Szal, T., Remme, J., Jaeger, L., Vázquez-Laslop, N., Korostelev, A. A., and Mankin, A. S. (2020) Ribosome engineering reveals the importance of 5S rRNA autonomy for ribosome assembly, *Nat. Commun.*, **11**, 2900, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16694-8>.
38. Davis, J. H., Tan, Y. Z., Carragher, B., Potter, C. S., Lyumkis, D., and Williamson, J. R. (2016) Modular assembly of the bacterial large ribosomal subunit, *Cell*, **167**, 1610-1622, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.020>.
39. Thoms, M., Lau, B., Cheng, J., Fromm, L., Denk, T., Kellner, N., Flemming, D., Fischer, P., Falquet, L., Berninghausen, O., Beckmann, R., and Hurt, E. (2023) Structural insights into coordinating 5S RNP rotation with ITS2 pre-RNA processing during ribosome formation, *EMBO Rep.*, **24**, e57984, <https://doi.org/10.15252/embr.202357984>.
40. Carbone, C. E., Loveland, A. B., Gamper, H. B., Jr., Hou, Y. M., Demo, G., and Korostelev, A. A. (2021) Time-resolved cryo-EM visualizes ribosomal translocation with EF-G and GTP, *Nat. Commun.*, **12**, 7236, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27415-0>.

THE ROLE OF NONCANONICAL STACKING INTERACTIONS OF HETEROCYCLIC RNA BASES IN RIBOSOME FUNCTIONING

V. G. Metelev¹, E. F. Baulin^{2#}, and A. A. Bogdanov^{1,3,4*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: bogdanov@belozersky.msu.ru

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

Identification and analysis of recurrent elements (motifs) in DNA, RNA and protein macromolecules is an important step in studying the structure and functions of these biopolymers. In this paper, we investigated the functional role of NA-BSE (Non-Adjacent Base-Stacking Element), a widespread motif in the tertiary structure of various RNAs, in RNA-RNA interactions at various stages of ribosome function during translation of genetic information. Motifs of this type, reversibly formed during mRNA decoding, movement of ribosome subunits relative to each other, and movement of mRNA and tRNA along the ribosome during translocation, are described. EF-G-dependent formation of NA-BSE involving nucleotide residues of 5S rRNA and 23S rRNA is considered in particular.

Keywords: stacking interactions, tertiary RNA structure, ribosomal RNA, A-, P-, E-site of tRNA, RNA motifs