

Специфические и неспецифические РНК-связывающие свойства роданезы: новая функция старого домена.

Смирнов Александр Владимирович<sup>1,2</sup>, Энтелис Нина Сергеевна<sup>2</sup>, Крашенинников Игорь Александрович<sup>1</sup>, Мартэн Робер<sup>2</sup>, Тарасов Иван Алексеевич<sup>2</sup>.

Аспирант

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия

<sup>2</sup>Университет Луи Пастера (ULP), Страсбург, Франция

[Skard1@yandex.ru](mailto:Skard1@yandex.ru)

Роданеза (тиосульфат-цианидсульфуртрансфераза) – весьма консервативный белок, обнаруженный у организмов всех царств жизни. Несмотря на многолетнюю историю изучения (роданеза является классическим объектом исследований фолдинга белка), её функция в клетке до сих пор остаётся неясной. Вместе с тем, многочисленные данные показывают, что белки, содержащие роданезо-подобные домены, вовлечены в самые разнообразные клеточные процессы: от детоксикации цианида и формирования железосерных кластеров в митохондриях до метаболизма селена, модификации тРНК и участия в ряде сигнальных путей. Роданеза синтезируется в цитозоле на свободных рибосомах в энзиматически неактивной форме, после чего направляется в матрикс митохондрии, где принимает свою нативную конформацию. Каким образом удаётся сохранять роданезу в неактивной форме в цитозоле, до сих пор не ясно. Используя методы Норз-Вестерн блот гибридизации и задержки в геле, мы обнаружили, что химически денатурированная роданеза (в отличие от нативного фермента) способна взаимодействовать с 5S рРНК человека. Так как ранее было показано, что 5S рРНК функционирует как шаперон при связывании рибосомального белка L5, мы предположили, что она может оказывать подобный эффект и на денатурированную роданезу. Для проверки этого предположения был использован стандартный тест на шаперонную активность - измерение кинетики агрегации денатурированной роданезы. При разбавлении денатуранта роданеза начинает сворачиваться по ряду альтернативных путей, приводящих к появлению интермедиатов с принципиально разными физико-химическими характеристиками. Основная масса фермента сворачивается в интермедиат, который сравнительно медленно и необратимо подвергается агрегации. Мы показали, что в присутствии уже 1,5-кратного молярного избытка 5S рРНК человека, агрегация роданезы оказывается сильно подавленной (стадия плато достигается уже через 1,5 мин). Данный эффект оказался насыщаемым и специфичным в отношении 5S рРНК. Более того, он также конформационно-специфичен: только 5S рРНК человека с нетипичной геометрией типа А-семейства (обладающая вследствие особенностей стэкинга доменов более разветвлённой трёхмерной структурой – в отличие от более компактной классической С-конформации) способна подавлять агрегацию роданезы. Интересно, что нативная 5S рРНК дрожжей, предположительно обладающая А-конформацией, оказалась столь же эффективной в остановке агрегации денатурированной роданезы. Вместе с тем, хотя 5S рРНК, очевидно, вызывает определённые конформационные перестройки в денатурированной роданезе, предотвращая её агрегацию, она не позволяет ей принимать нативную конформацию, что было продемонстрировано энзиматическими тестами. Исследования взаимодействия роданезы с 5S рРНК методом задержки в геле в присутствии конкурирующих РНК показали, что денатурированная роданеза обладает неспецифической РНК-связывающей активностью. Однако комплексы, образуемые с другими РНК, очевидно, оказываются непродуктивными: роданеза продолжает агрегировать. Напротив, комплекс с 5S рРНК А-семейства продуктивен: конформационная перестройка роданезы предотвращает агрегацию. Анализ влияния специфических и неспецифических конкурентов на связывание роданезы с 5S рРНК А-семейства показывает, что ~30% РНК оказывается специфически связанной в прочные, очень медленно обменивающиеся комплексы. Полученные данные являются первой демонстрацией РНК-связывающих свойств роданезных доменов. Они позволяют предположить, что 5S рРНК может участвовать в «консервировании» роданезы в энзиматически неактивной конформации в цитозоле.