

## НОВОСТИ НАУКИ

### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РИБОПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЯ

Белки выполняют свои клеточные функции в определенное время и в определенном месте, и их активность очень точно и тонко регулируется. Важный механизм, контролирующий активность белка, - аллостерическая регуляция. Связывание регуляторов в аллостерическом центре приводит к структурным изменениям в белке, которые вовлекают и активный центр, что приводит, в конечном итоге, к изменению функциональной активности белка. В аллостерических олигомерных белках субъединицы действуют "сообща": когда регулятор присоединяется к одной субъединице, другая увеличивает сродство к лигандам, что позволяет модулировать активность белка и его функции при незначительных изменениях в концентрации регулятора.

В статье "A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression", опубликованной в журнале "Science", том 306, стр.275-279 (8 октября 2004) (Maumita Mandal, Mark Lee, Jeffrey E. Arrick, Zasha Weinberg, Gail Mitchell Emilsson, Walter L. Ruzzo, and Ronald R. Breaker), Maumita Mandal и коллеги сообщают, что регуляция активности при помощи кооперативного связывания является характерной особенностью и молекул РНК. Авторы приводят описание информационного элемента бактериальной мРНК, так называемого "рибопереключателя" (riboswitch), в котором аминокислота глицин приводит в действие две аллостерические "субъединицы" РНК. Эта совместная активация регулирует экспрессию генов без участия других дополнительных регуляторных белков.

Глицин-зависимый рибопереключатель объединяет ряд недавно идентифицированных природных мотивов РНК, которые контролируются другими молекулярными регуляторами. В них высоко селективное связывание маленьких молекул с мотивами РНК активирует или подавляет экспрессию близлежащих генов путем конформационных изменений в молекулах мРНК, которые влияют на транскрипцию или трансляцию.

РНК элементы нового глицин-зависимого рибопереключателя располагаются в нетранслируемых областях генов, кодирующих белковый комплекс, который позволяет бактериям расщеплять глицин, используя его в качестве источника энергии в том случае, когда концентрация глицина превышает определенный пороговый уровень. При ограниченном количестве глицина экспрессии компонентов этой системы не происходит. В противном случае, аминокислота, необходимая для синтеза белка, участвовала бы в процессах генерации энергии, которые в нормальных условиях используют другие источники. И наоборот, если обычного топлива (углеводов или жиров) недостаточно, тогда микроорганизм "имеет право" выбора использовать другие источники энергии. Таким образом, глициновый рибопереключатель должен удовлетворять двум важным критериям: действовать как генетический "переключатель" и надежно распознавать глицин с высокой специфичностью в пределах узкого диапазона концентрации. Эти два критерия трудно выполнимы для белковой молекулы, и поэтому на данную роль был выбран рибопереключатель. Механизм действия нового рибопереключателя довольно интересен и наглядно показывает важную роль РНК как регулирующего элемента.

В действительности, рибопереклюатели - это природные представители класса искусственных лигандных нуклеиновых кислот, так называемых аптамеров. Сначала аптамеры выделяли из сложных смесей синтетических последовательностей путем эволюционных методов *in vitro*. Они формируют связывающие карманы, которые распознают огромное разнообразие маленьких органических молекул с высоким сродством и специфичностью. В различных случаях были идентифицированы разные аптамерные последовательности для одного и того же лиганда. Глициновый рибопереклюатель состоит из двух различных (типов) аптамеров, которые независимо присоединяются к одной молекуле глицина. В генах различных бактерий оба аптамера всегда соединены в тандем и отделены только короткими линкерными последовательностями. Индивидуальному РНК мотиву необходимо 100-кратное увеличение концентрации глицина для выявления минимально определяемого связывания. Однако в полном последовательном рибопереклюателе кооперативное связывание глицина сужает этот диапазон концентраций до 10 - кратного. Авторы отмечают, что взаимодействие двух глицин-связывающих участков в рибопереклюателе *Vibrio cholerae* соответствует такому же кооперативному связыванию четырех кислород-связывающих участков в гемоглобине.

С эволюционной точки зрения, замечательно, что в природе существуют несколько различных глицин-связывающих аптамерных мотивов, выстроенных в тандем для того, чтобы они могли функционировать вместе *in vivo* как регуляторы, которые распознают глицин в пределах более узкого диапазона концентрации, чем любой аптамер в отдельности. Также примечателен тот факт, что молекулы РНК, насчитывающие только от 86 до 126 нуклеотидов, способны к связыванию с органическим лигандом в 75 дальтон с такой впечатляющей специфичностью, что глицин можно эффективно отличить от близко родственных аминокислот и их производных.

Еще более примечателен тот факт, что для каждого механизма, использующего рибопереклюатели для контроля экспрессии гена, можно "задействовать" аналогичную искусственную систему, которая исходно была разработана лабораторным путем. Селективные аптамеры *in vitro*, которые влияют на экспрессию репортерных генов в клетках, предвосхитили открытие подобных природных рибопереклюателей. Разработанные аллостерические рибозимы, регулируемые небольшими органическими молекулами, предшествовали недавнему открытию первого каталитического рибопереклюателя, регулируемого глюкозамин-6-фосфатом. Есть даже пример аллостерического рибозима, в котором два аптамера, специфичные для флавиномононуклеотида и теofilлина, выровнены в тандеме для того, чтобы действовать как "совместный (кооперативный) включатель" в процессе расщепления рибозима. В течение десятилетий ученые разрабатывали синтетические системы, которые отвечали бы функциональным природным принципам. В случае с рибопереклюателями, разработка функциональных нуклеокислотных молекул вдохновила ученых на поиск и открытие близко расположенных природных аналогов.

Действительно ли принцип регуляции генов рибопереклюателями ограничен бактериями, или он также обнаружен в эукариотах? Эти регуляторы, по-видимому, широко распространены в бактериях, однако они также, вероятно присутствуют в эукариотных генах растений. Интересно, могут ли вышеуказанные регуляторы также быть найдены в высших эукариотах и даже у людей. Если это так, тогда открываются совершенно новые горизонты фармацевтических исследований молекул РНК в качестве будущих мишеней для лекарственных препаратов

## ТЕЛЬЦА ВКЛЮЧЕНИЯ - ЗАЩИТА НЕЙРОНОВ?

В статье "Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death", опубликованной в журнале "Nature" том 431, стр. 805 - 810 Montserrat Arrasate и коллеги (Montserrat Arrasate, Siddhartha Mitra, Rik S. Schweitzer, Mark R. Segal, Steven Finkbeiner) доказывают, что тельца включения белка-мутанта, найденные в определенных нейронах и характерные для болезни Гентингтона, уменьшают вероятность гибели нейронов, по крайней мере, в культуре клеток.

Невропатологам давно известно, что ряд заболеваний ЦНС характеризуется аномальным накоплением макромолекул внутри клеток, к числу которых относятся "тельца включения", найденные в головном мозге пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, прионными заболеваниями, боковым амиотрофическим склерозом, болезнью Паркинсона и группой из девяти так называемых полиглутаминных заболеваний, среди которых заболевание Гентингтона - самое распространенное. Общим фактором полиглутаминных заболеваний является генетическая мутация, которая приводит к неправильным повторам аминокислотного остатка глутамина в кодируемом белке.

С появлением научных исследований молекулярных генетиков и клеточных биологов стало ясно, что в наследственных формах каждого из этих заболеваний тельца включения содержат белок, который кодируется геном, несущим мутацию, порождающую болезнь.

Особенный интерес вызывают полиглутаминные заболевания, вообще, и болезнь Гентингтона, в частности. Тельца-включения при полиглутаминных заболеваниях содержат белок-мутант. В случае болезни Гентингтона этот белок получил название huntingtin (htt). Включения, содержащие мутантный htt, найдены в главном участке нейродегенерации - стриатуме.

Интерпретация результатов многолетних экспериментальных исследований очень противоречива: одни авторы считают, что "тельца включения" являются причиной заболевания, другие - защищают от заболевания, а третьи - что обнаруженные изменения просто носят случайный характер. Большинство ученых все же полагает, что тельца включения способствуют развитию заболевания, но точка зрения о том, что тельца включения несут защитный характер, изолируя вредный белок-мутант, также довольно популярна.

Особенность работы Arrasate и ее коллег состоит в том, что авторы разработали тонкий современный метод для оценки факторов, которые влияют на гибель нейрона в культуре. Они использовали обычную модель заболевания Гентингтона, в которой нейроны подвергаются трансфекции с патогенным фрагментом гена белка-мутанта htt (htt-экзон 1). Они разработали автоматизированную систему микроскопии для одновременного слежения за образованием телец-включений, присутствием диффузного белка-мутанта и выживанием того же самого нейрона на протяжении нескольких дней. Чтобы наблюдать за смещением белка-мутанта в трансфицированных клетках, ученые использовали соединение белка-мутанта с зеленым флуоресцентным белком. Как и ожидалось, произошло формирование телец включения в ядре и в цитоплазме, и вследствие этого нейроны погибали.

Arrasate и коллеги произвели математический анализ вероятной смерти клеток в культуре ткани. Ученые пришли к двум выводам. Сначала, вероятность гибели нейронов была низкой, особенно в тех нейронах, которые были трансфицированы непатогенной формой htt-экзон 1, и оказалась высокой в клетках, экспрессирующих htt-экзон 1 с полиглутаминовым трактом; кроме того, риск гибели нейрона возрос с увеличением размера полиглутаминного фрагмента. Во вторых, ученые обнаружили, что вероятность гибели в клетках, содержащих мутантный htt-экзон 1, увеличивалась во времени.

Какие переменные повлияли на риск клеточной смерти? Как и ожидалось, ими оказались тельца включения. Основные особенности формирования телец включения (размер и рост) пропорциональны времени, иными словами, модель точно повторила процесс течения болезни Гантингтона. Однако, изучая один и тот же нейрон на протяжении определенного времени, Agtasate и коллеги обнаружили, что клетки, которым не удалось сформировать тельца включения, были больше подвержены гибели. Когда нейроны, экспрессирующие одинаковые уровни белка-мутанта htt-экзон 1, изучили индивидуально (независимо), то у тех нейронов, в которых формировались тельца включения, наблюдался заметно сниженный риск смерти по сравнению с нейронами, в которых белок-мутант htt-экзон 1 остался диффузным. Кроме того, формирование телец включения уменьшило количество диффузного белка-мутанта htt в другом месте нейрона.

То есть формирование телец включения фактически продлило выживание и защитило нейроны, по-видимому, сокращая количество токсина (диффузно распространенной формы белка-мутанта htt). Хотя результаты убедительно свидетельствуют о том, что мутантные полиглутаминные тельца включения являются защитными и непатогенными, нельзя исключить, что главными токсическими видами являются ранние предшественники телец включений, так называемые микроагрегаты.

Несмотря на то, что авторы не смогли окончательно разрешить проблему биологической роли полиглутаминных, сильная сторона этого научного исследования заключается в самом подходе: способность определять, является ли обнаруженная особенность клетки при заболевании патогенной или просто случайной. Это поможет ученым распознавать механизмы самого заболевания. Также интересно будет посмотреть, закончатся ли на этом споры ученых относительно патогенной роли телец-включений в полиглутаминных заболеваниях.

Материал подготовлен при участии О Рыженковой