

Рецензенты:

акад. РАН, д-р хим. наук, проф. *А. А. Богданов* (кафедра химии природных соединений химического факультета и НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова);
чл.-кор. РАН, д-р хим. наук *В. И. Цетлин* (руководитель лаборатории рецепции нейропептидов Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН)

Спирин А.С.

С722 Молекулярная биология : рибосомы и биосинтез белка : учебник для студ. высш. проф. образования / А. С. Спирин. — М. : Издательский центр «Академия», 2011. — 496 с., [16] с. цв. ил.

ISBN 978-5-7695-6668-4

Настоящий учебник охватывает часть общего курса молекулярной биологии, посвященную структурным и функциональным аспектам биосинтеза белков, которую автор читает на биологическом факультете МГУ им. М. В. Ломоносова. Вместе с тем объем включенного в учебник материала соответствует уровню требований кандидатского минимума по специальности «Молекулярная биология». В книге отражены современные тенденции и знания в данной области науки, приведен достаточно полный список литературы по охватываемым проблемам. Книга не имеет аналогов в современной мировой литературе.

Для студентов учреждений высшего профессионального образования. Может быть полезен научным работникам и преподавателям вузов.

УДК 577.2(075.8)
ББК 28.070я73

Учебное издание

Спирин Александр Сергеевич

Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка

Учебник

Редактор *И. В. Пирогова*. Технический редактор *О. Н. Крайнова*
Компьютерная верстка: *Г. Ю. Никитина*. Корректор *Г. Н. Петрова*

Изд. № 101112096. Подписано в печать 21.12.2010. Формат 70 × 100/16.
Гарнитура «Ньютон». Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 41,6 (в т.ч. цв. вкл. 1,3).
Тираж 1 000 экз. Заказ № 2322.

Издательский центр «Академия». www.academia-moscow.ru
125252, Москва, ул. Зорге, д. 15, корп. 1, пом. 266. Адрес для корреспонденции 129085, Москва, пр-т
Мира, 101В, стр. 1, а/я 48. Тел./факс: (495)648-0507, 616-0029.

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.60.953.Д.007831.07.09 от 06.07.2009.

Отпечатано с электронных носителей издательства.
ОАО «Тверской полиграфический комбинат», 170024, г. Тверь, пр-т Ленина, 5.
Телефон: (4822) 44-52-03, 44-50-34. Телефон/факс: (4822) 44-42-15.
Home page — www.tverpk.ru Электронная почта (E-mail) — sales@tverpk.ru

Оригинал-макет данного издания является собственностью Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом без согласия правообладателя запрещается

© Спирин А.С., 2011
© Образовательно-издательский центр «Академия», 2011
© Оформление. Издательский центр «Академия», 2011

Настоящий учебник написан на основе курса лекций по структуре рибосом и биосинтезу белка, который я читаю студентам старших курсов биологического факультета Московского государственного университета. Лекции были частью основного курса по молекулярной биологии в течение более трех десятилетий, и они претерпели значительную эволюцию по мере развития знаний в этой области. Наука продолжает идти вперед, и читатели должны быть готовы к тому, что некоторые факты, утверждения и идеи, включенные в книгу, могут оказаться не совсем полными или не совсем современными. В любом случае книга является учебным руководством, а не исчерпывающим обзором. Она обеспечивает основу для знаний и развития текущих идей в области биосинтеза белка, дает примеры наблюдений и их объяснения. Я понимаю, что некоторые объяснения и выводы могут быть предварительными и спорными, но надеюсь, что они послужат стимулом для размышлений и обсуждения проблем.

У книги есть прототип: это моя монография «Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка», вышедшая в 1986 г. в издательстве «Высшая школа», Москва. Здесь я в основном выдерживаю предыдущий порядок представления тем и подразделений на главы. Однако содержание глав было подвергнуто значительной ревизии и дополнено. Короткая вводная глава 1 теперь значительно расширена и включает историю открытия кодирующих и не кодирующих РНК, перечисление как генетических, так и негенетических функций различных видов РНК, описание основных принципов макромолекулярной структуры РНК, а также изложение гипотезы о древнем мире РНК, его происхождении и эволюции в клеточные формы жизни. Главы по морфологии рибосомы (гл. 5), рибосомной РНК (гл. 6), терминации трансляции (гл. 13), котрансляционному сворачиванию и трансмембранному транспорту белков (гл. 17) полностью переписаны в соответствии с новыми данными. Главы 7 и 8 издания 1986 г., посвященные рибосомным белкам, объединены и дополнены новым материалом по четвертичной структуре рибосомы. Фактически заново написаны главы по контролю трансляции у прокариот (гл. 15) и эукариот (гл. 16). Заключительная глава 18 об основных принципах структурной организации и функционирования рибосомы теперь включает также рассмотрение рибосомы как молекулярной машины.

В этой книге (как и в предыдущей) литературные ссылки приведены в основном в целях обучения и таким образом список литературы, имеющийся в конце каждой главы, далеко не полный. Чтобы дать представление об истории открытий, я цитирую преимущественно пионерские исследования в обсуждаемой области и по ходу текста указываю руководителей соответствующих научных групп в русской транскрипции и год публикации работы. Сами же ссылки на работы в оригинальной транскрипции, а также ссылки на обзоры даны, как уже отмечено выше, в конце каждой главы. Во многих случаях при ссылках на работы коллективов авторов фамилии руководителей групп в списках литературы подчеркнуты.

Большая часть иллюстраций по структуре рибосом и их компонентов, определенной в конце 1990-х и 2000-х гг. с помощью рентгеноструктурного анализа, наряду со ссылками на соответствующие публикации, снабжена также ссылками на идентификационный номер в международном банке белковых структур — *Protein Data Bank* (PDB ID). Книга содержит и много оригинальных иллюстраций, сделанных благодаря ценной помощи моих сотрудников в Институте белка РАН в Пушкино. Я также благодарен моим коллегам, работающим как в Институте белка, так и вне его, — А. А. Богданову, В. Д. Васильеву, А. В. Ефимову, В. Н. Лузикову, Л. Л. Киселеву, В. А. Колбу, Л. П. Овчинникову, А. Г. Рязанову и А. В. Финкельштейну — за их вклад в написание и обсуждение ряда глав этого учебника. Хочу принести особую благодарность А. Коммеру за неоценимую помощь в приготовлении всего иллюстрационного материала книги, Т. Б. Кувшинкиной за большой вклад в составление и упорядочивание списков литературы к каждой главе и Л. Н. Рожанской за повседневную техническую помощь. Кроме того, я весьма признателен сотруднику кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова П. А. Каменскому за помощь в подготовке рукописи и в демонстрации ее материала на моих лекциях.

А. С. Спирин,
Москва — Пушкино, 2008 г.

Глава 1

МИР РНК И БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ

1.1. Центральная догма молекулярной биологии

В 40-х гг. XX в., прежде всего на основе цитологических и биохимических наблюдений Касперсона (1941) и Браше (1941 — 1942), стало складываться представление, что ДНК, локализуемая в ядрах клеток, в их хромосомах, самым тесным образом связана с аппаратом наследственности, а РНК — это обязательный компонент клеточной цитоплазмы, ответственный за биосинтез белка. Прямые эксперименты Эйвери, МакЛеод и МакКарти (1944) доказали, что чистая, изолированная из клеток ДНК может быть носителем наследственных признаков организма. Все большее количество исследователей — в первую очередь биохимиков и цитологов — начинали склоняться к мысли, что ДНК или ее комплексы с белком могут быть основными носителями генетической информации, а РНК — посредником, воспринимающим эту информацию от ДНК и реализующим ее путем биосинтеза белков.

К началу 1950-х гг. Чаргафф установил факт видовой специфичности состава ДНК, показав, что соотношение четырех сортов ее мономеров — гуанилового (G), аденилового (A), цитидилового (C) и тимидилового (T) — различается у разных видов организмов. Этот факт прямо соответствовал предполагавшейся генетической роли ДНК. Были найдены также интересные закономерности в нуклеотидном составе ДНК, названные «правилами Чаргаффа»: независимо от видовых различий, во всех ДНК количество G было равно количеству C, а количество A — количеству T ($G = C, A = T$). В 1953 г. Уотсон и Крик, используя эти экспериментальные данные по химическому составу ДНК, а также результаты рентгеноструктурных анализов ориентированных нитей ДНК, указывавшие на спиральный характер укладки ее полимерных молекул (Уилкинс и Фрэнклин), предложили модель макромолекулярной структуры ДНК. Это была двойная спираль, где две полимерные нити ДНК закручены вокруг общей оси и удерживаются вместе за счет парных взаимодействий G с C и A с T (рис. 1.1). Непосредственно из этой структуры вытекал механизм ее точного воспроизведения, что впервые дало объяснение наследственности — воспроизведению генов в процессах размножения. Так полвека назад родилась новая наука — молекулярная биология.

В основе воспроизведения (редупликации) структуры ДНК лежит так называемый принцип комплементарности: в двойной спирали две полимерные цепи ДНК связаны друг с другом бок о бок водородными связями за счет образования пар G : C, C : G, A : T и T : A (здесь и далее нековалентные связи обозначены двоеточиями). Если две цепи двойной спирали расходятся, то на каждой из них может строиться (полимеризоваться) новая *комплементарная* цепь, так что напротив G исходной цепи устанавливается C новой цепи, напротив C старой цепи — G



A

B

Рис. 1.1. Схема двойной спирали ДНК, ее комплементарной редупликации (*A*) и комплементарного синтеза РНК на одной из цепей ДНК (транскрипции) (*B*)

новой цепи, напротив А—Т, а напротив Т—А; в результате этого получают две дочерние двойные спирали, полностью идентичные исходной — материнской (см. рис. 1.1, *A*).

РНК химически подобна ДНК. В обоих случаях это линейные, неразветвленные полимеры нуклеотидов с пентозофосфатным остовом и четырьмя типами азотистых (пуриновых и пиримидиновых) оснований в качестве боковых групп. Существует только два небольших отличия цепи РНК от одиночной цепи ДНК: 1) пятиуглеродный сахар (пентоза) в РНК представлен рибозой, а в ДНК его производным — 2'-дезоксирибозой; 2) один из двух пиримидиновых нуклеотидов в РНК представлен уридилловым остатком (U), вместо его метилированного производного Т в ДНК. Вышеупомянутый принцип комплементарности обеспечивает механизм репликации РНК на матрице ДНК. Разница лишь в том, что РНК полимеризуется только на одной из двух разошедшихся цепей двойной спирали ДНК

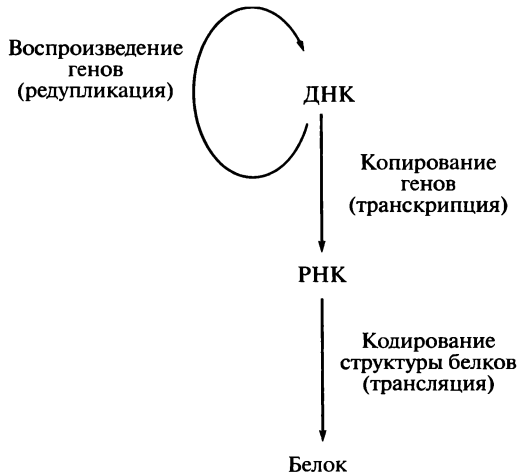


Рис. 1.2. Центральная догма молекулярной биологии

(см. рис. 1.1, **Б**). Разумеется, при синтезе РНК напротив А цепи ДНК устанавливается уридиловый рибонуклеотид (U) вместо тимидилового дезоксирибонуклеотида (Т) при синтезе ДНК. Реплицирующаяся цепь РНК таким образом является точной копией противоположной цепи ДНК, с заменой Т на U. Процесс репликации сопровождается отделением цепи РНК от ДНК. В результате такой репликации РНК образуется как гибкий одноцепочечный полимер в отличие от жесткой двойной спирали ДНК.

Будучи копиями определенных функциональных отрезков цепи ДНК — генов, цепи РНК призваны служить матрицами для синтеза другого типа полимеров — полипептидных цепей белков. Так как белки состоят из двадцати разных сортов мономеров (аминокислот), а РНК — только из четырех сортов мономеров (нуклеотидов), то детерминация аминокислотной последовательности полипептидной цепи нуклеотидной последовательностью РНК требует того, чтобы каждая аминокислота кодировалась комбинацией из нескольких — не менее трех — нуклеотидов. Действительно, именно триплетный код был сначала постулирован на основании теоретических соображений, а затем и доказан экспериментально. Таким образом, за РНК была признана *генетическая роль* посредника между генами и белками: с одной стороны, РНК представлялась как совокупность копий генов, т.е. копий отрезков ДНК, а с другой — как непосредственные матрицы, последовательности нуклеотидных триплетов которых кодируют аминокислотные последовательности полипептидных цепей в процессе синтеза белков. Вышесказанное и представляет собой «центральную догму молекулярной биологии», сформулированную Криком и выраженную в виде схемы: ДНК → РНК → → белок, где прямые стрелки обозначают необратимый поток информации от ДНК через РНК к белку (рис. 1.2).

1.2. Кодированные и неcodированные РНК

Ко второй половине 50-х гг. XX в. уже было установлено, что синтез белков в живых клетках осуществляется рибонуклеопротеидными частицами — рибосомами — и что РНК, присутствующая в рибосомах в качестве их основного компо-

нента (рибосомная РНК), представляет собой подавляющую часть тотальной РНК клетки. Было довольно логично предположить, что именно полирибонуклеотидные цепи рибосомных РНК служат матрицами для синтеза белков. «Долго считалось, что структурная информация переносится от генов к стабильным матрицам, таким как рибосомная РНК, копирующим гены и поддерживающим в цитоплазме информацию, необходимую для синтеза белков. Каждый ген, как полагали, детерминирует образование геноспецифических рибосомных частиц, которые в свою очередь и обеспечивают синтез определенного белка (см. Крик, 1958)» (цит. по: Jacob, F., and Monod, J., 1961, p. 195).

Для проверки этого предположения было проведено параллельное с ДНК определение нуклеотидного состава тотальных РНК у тех же видов бактерий, среди которых было найдено большое разнообразие состава ДНК (Спирин, Белозерский и др., 1957; Белозерский и Спирин, 1958, 1960). Вопреки ожиданию, что основная масса клеточной РНК как предполагаемый посредник в переносе генетической информации от ДНК к белкам должна по своему нуклеотидному составу копировать нуклеотидный состав ДНК своего организма (лишь с заменой тимина на урацил), оказалось, что состав тотальной РНК не повторяет состава ДНК и вообще эволюционно гораздо более стабилен по сравнению с ДНК (табл. 1.1). Этот результат вызвал сенсацию в научном мире. В 1959 г. Крик констатировал: «Проблема кодирования к настоящему времени прошла три фазы. На первой фазе — фазе блужданий — были сделаны различные предположения, но ни одно не было достаточно точным, чтобы выдержать возражения. Вторая фаза — оптимистическая — была начата Гамовым в 1954 г.; он был достаточно смел, чтобы предложить довольно точный код. Это стимулировало ряд исследователей к тому, чтобы показать некорректность его предположений, и тем самым несколько способствовало точности мышления в этой области. Третья фаза — фаза замешательства — была инициирована статьей Белозерского и Спирина в 1958 г. Представленные там свидетельства показали, что наши идеи во многих важных отношениях были слишком упрощенными» (цит. по: Krick, F. H. C., 1958, p. 35). Описывая создавшуюся ситуацию, Жакоб и Моно добавляют следующее к тому, что было процитировано ранее относительно предположения о кодирующей

Таблица 1.1

Сравнение нуклеотидного состава ДНК и РНК у некоторых бактерий

Вид	ДНК, (G + C)/(A + T)	РНК, (G + C)/(A + U)
<i>Sarcina lutea</i>	2,57	1,32
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2,08	1,45
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,20	1,24
<i>Salmonella typhosa</i>	1,13	1,21
<i>Escherichia coli</i>	1,09	1,21
<i>Proteus vulgaris</i>	0,68	1,22
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,53	1,05
<i>Clostridium perfringens</i>	0,45	1,06

клетки рибосомной РНК: «В последние годы, однако, эта гипотеза столкнулась с несколькими трудностями. Прежде всего, различия в нуклеотидном составе, найденные в ДНК различных видов бактерий, как оказалось, не отражаются в нуклеотидном составе рибосомной РНК (Belozersky and Spirin, 1960)» (цит. по: Jacob, F., and Monod, J., 1961, p. 195). Таким образом, все оказывалось сложнее, чем постулировалось «центральной догмой молекулярной биологии» в ее первоначальном виде. Во всяком случае полученные результаты по несоответствию нуклеотидного состава тотальной клеточной РНК нуклеотидному составу ДНК впервые указали на то, что преобладающая доля тотальной клеточной РНК, и в первую очередь рибосомная РНК, по-видимому, не является кодирующей РНК. Таким образом, именно с упомянутых работ 1957 — 1958 гг. можно начинать историю открытия *некодирующих РНК* в живых клетках.

С тех пор, и особенно в 2000-х гг., некодирующие РНК заняли прочные позиции в молекулярной биологии. Их изучение — одна из самых актуальных и бурно развивающихся областей этой науки в настоящее время. Помимо рибосомной РНК, было открыто множество других классов некодирующих РНК. Адаптерная РНК, или тРНК (transfer RNA, tRNA) — второй по представительству класс клеточных РНК после рибосомных РНК — была открыта тоже в 1957 г. одновременно американскими (Хоагланд, Замечник и Стефенсон) и японскими исследователями (Огата и Нохара). Она также не является матрицей для синтеза белков, хотя вовлечена в процесс первичной декодировки генетического кода путем специфического акцептирования аминокислот через ферменты — аминоктил-тРНК-синтазы (см. гл. 3). «Настоящие» некодирующие РНК, кроме рибосомных РНК, были открыты много позже, прежде всего потому, что каждый их вид представлен в клетках в малых количествах (см.: Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F., eds., 2006). К ним относятся РНК, участвующие в качестве затравки в синтезе ДНК и в удлинении теломеров хромосом, без чего невозможна репродукция генов и клеток; малые ядерные РНК, регулирующие процессы транскрипции (синтеза) мРНК на генах и процессы посттранскрипционных модификаций предшественников мРНК; малые цитоплазматические РНК, участвующие в регуляции процессов трансляции (синтеза белка) на рибосомах; 4,5S и 7S РНК, играющие структурную роль и собирающие на себе специальные белки с образованием функционально важных рибонуклеопротеидных частиц, таких как SRP-частицы, ответственные за экспорт белков через клеточную мембрану (см. гл. 17); многие другие виды РНК. Нельзя не упомянуть также открытые в 1982 — 1983 гг. каталитические РНК — рибозимы (Чек и др., 1982; Алтман и др., 1983). Особый интерес представляет класс так называемых микроРНК, открытых совсем недавно (2001) и вызвавших настоящий научный бум. Оказалось, что микроРНК (короткие РНК длиной всего 20 — 25 нуклеотидных остатков, комплементарные участкам мРНК) в клетках высших организмов, в том числе человека, играют ключевую роль в регуляции синтеза белков, определяющих эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку и другие важные процессы (см. гл. 16). В настоящее время имеются основания полагать, что экспрессия по крайней мере одной трети наших генов контролируется различными микроРНК. В целом же только около 2 % геномной ДНК человека кодируют белки, и в то же время 80 % генома транскрибируется в различные виды некодирующих РНК, функции большинства из которых пока не известны. Анализ «транскриптома», т. е. репертуара РНК, в клетках животных и человека является одной из самых «горячих точек» современной молекулярной биологии (см., например, обзор: Kapranov, P., Gingeras, T. R., et al., 2007).

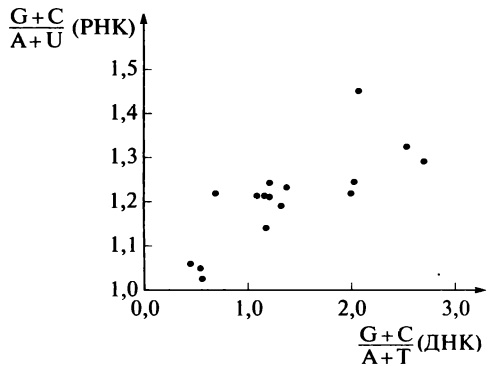


Рис. 1.3. Корреляция нуклеотидного состава тотальной клеточной РНК с нуклеотидным составом ДНК при анализе различных видов бактерий.

Belozersky and Spirin (1958) *Nature* **182**: 111—112

При сравнении нуклеотидного состава ДНК с составом тотальной РНК у разных видов бактерий (Спирин, Белозерский и др., 1957; Белозерский и Спирин, 1958) выявилась и еще одна интересная особенность: несмотря на несходство составов

ДНК и РНК и эволюционную консервативность основной массы РНК, наблюдалась определенная тенденция к увеличению соотношения $(G + C)/(A + U)$ в РНК при переходе к видам с увеличивающимся соотношением $(G + C)/(A + T)$ в их ДНК (см. табл. 1.1). Это указывало на существование в тотальной РНК нормальных клеток бактерий небольшой фракции РНК, коррелирующей по своему нуклеотидному составу с ДНК исследуемых клеток, т.е. фракции ДНК-подобной РНК (рис. 1.3). Выявление такой корреляции было первым свидетельством того, что копиями структурных генов являются не эволюционно консервативные РНК белоксинтезирующих частиц — рибосом, а другие РНК, призванные программировать функционально неспецифические рибосомные частицы и быть гено- и видоспецифическими («ДНК-подобными») матрицами для синтезируемых на рибосомах белков.

Так было предсказано существование специальной фракции кодирующей РНК, позднее названной *messenger RNA* (mRNA), или *информационной РНК* (мРНК), представляющей собой копии структурных генов и кодирующей клеточные белки. Годом ранее в работе Волкина и Астрачана было показано, что заражение клеток *E. coli* бактериофагом индуцирует в них синтез короткоживущей РНК с соотношением нуклеотидов, подобным таковому в фаговой ДНК. Однако эта работа обратила на себя внимание лишь позднее, когда стало выясняться, что синтез фагоспецифической ДНК-подобной фракции РНК в зараженных клетках отражает не просто специфику фаговой инфекции, а может указывать на общее явление программирования белкового синтеза нерибосомными РНК. Именно продолжение этой работы в блестящих экспериментах на зараженных фагами бактериях, почти одновременно опубликованных тремя различными группами авторов в 1961 г. — англо-франко-американской (Бреннер, Жакоб и Меселсон), франко-американской (Гро, Гилберт, Уотсон и др.) и американской (Спигелман и др.), — окончательно утвердило факт существования, место и роль информационных РНК (мРНК) в процессе биосинтеза белка.

Итак, в процессе биосинтеза белка определились три основных участника, представляющих три основных класса РНК в клетке: 1) некодирующая *рибосомная РНК*, или рРНК, ответственная за формирование белоксинтезирующих частиц — рибосом; 2) *адаптерная РНК*, или тРНК, в русской научной литературе не совсем точно называемая транспортной РНК, ковалентно связывающая (акцептирующая) аминокислотные остатки и совместно с рибосомой участвующая в их включении в синтезируемую полипептидную цепь белка; 3) кодирующая *информационная РНК*, или мРНК, иногда также называемая матричной РНК, свя-

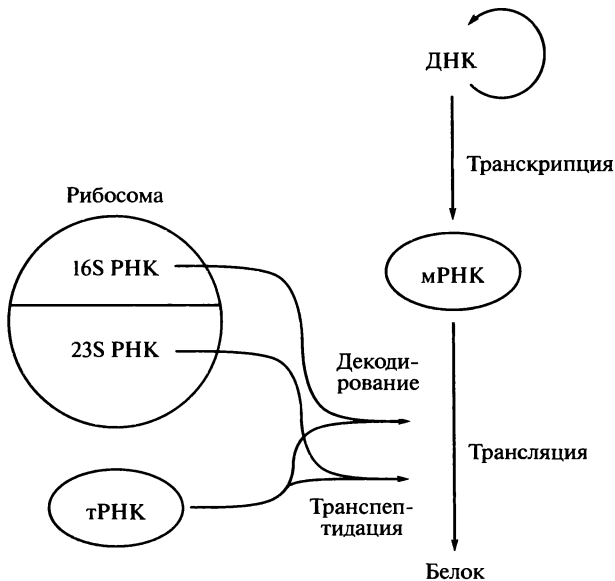


Рис. 1.4. Кодированная РНК (мРНК) и два основных типа некодирующих РНК (рибосомные РНК и тРНК)

зываются с рибосомой и определяющая порядок вхождения различных аминокислотированных тРНК в рибосому, а тем самым — аминокислотную последовательность синтезируемого белка (рис. 1.4).

1.3. Общая схема биосинтеза белков

Основные этапы биосинтеза белка схематически представлены на рис. 1.5. В центре всех событий этого процесса находятся рибосомы. *Рибосома* представляет собой большой макромолекулярный комплекс со сложной асимметричной четвертичной структурой, состоящей из рибонуклеиновых кислот (рибосомных РНК) и белка (рибосомного белка). Для того чтобы синтезировать белок, рибосома должна быть снабжена: 1) программой — мРНК, определяющей последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка; 2) субстратом — аминокислотами, из которых будет синтезирован белок; 3) химической энергией. Сама рибосома является катализатором процесса формирования пептидных связей, т. е. процесса последовательной полимеризации аминокислотных остатков с образованием полипептидной цепи.

Программа, которая определяет последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка, приходит от ДНК, т. е. из генома клетки. Отдельные участки двухцепочечной молекулы ДНК, которые называются генами, служат матрицами для синтезируемых одноцепочечных молекул РНК. Синтезированные молекулы РНК являются комплементарными репликами одной из цепей ДНК и, таким образом, представляют собой точную копию нуклеотидной последовательности другой цепи ДНК. Этот процесс копирования генов, выполняемый ферментом РНК-полимеразой, называется *транскрипцией*. В клетках эукариот, и в меньшей степени в клетках прокариот, синтезируемая РНК может подвергаться дополни-

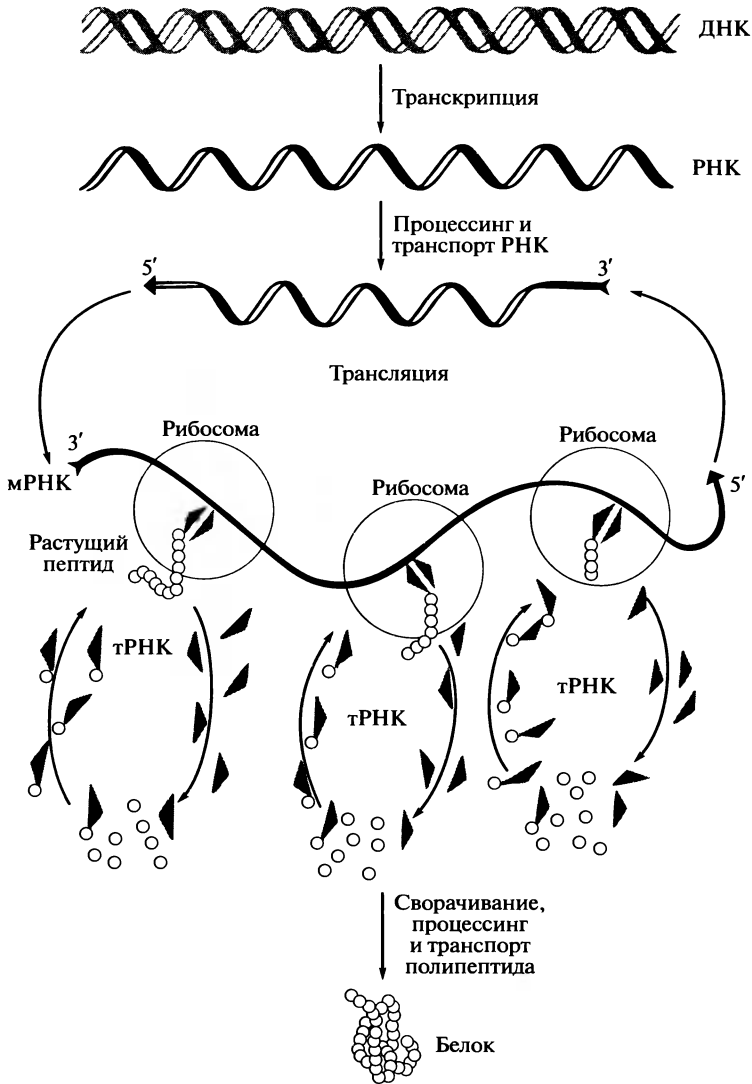


Рис. 1.5. Общая схема биосинтеза белка

тельным изменениям, которые называются *процессингом*, в результате чего определенные части нуклеотидной последовательности могут быть вырезаны из РНК, а в некоторых случаях изменены или отредактированы. Зрелая РНК связывается с рибосомами и служит программой, или матрицей, которая определяет аминокислотную последовательность в синтезируемом белке, — это информационная РНК (мРНК). Другими словами, поток информации от ДНК к рибосомам обеспечивается транскрипцией генов и процессингом РНК, приводящим к образованию мРНК.

В клетках эукариот образование мРНК, т.е. транскрипция, и большая часть процессинга происходят в ядре. В то же время функционирующие рибосомы находятся в цитоплазме. Таким образом, в потоке информации, идущем от ДНК к рибосомам, необходимой стадией является *транспорт* мРНК из ядра в цитоплазму. В клетках прокариот, как и в органеллах, расположенных в цитоплазме

зукариот (митохондриях и хлоропластах), рибосомы и ДНК не разделены мембраной, поэтому мРНК становится доступной для рибосом во время транскрипции, и тогда же начинается синтез белка; этот феномен называется *сопряженной транскрипцией-трансляцией*.

Белки состоят из аминокислот. Однако синтетическая машина рибосомы не использует свободные аминокислоты. Для того чтобы стать субстратом в процессе синтеза белка, аминокислота должна сначала связаться с аденилатной частью молекулы АТФ — это процесс активации аминокислоты. Затем аминокислотный остаток ковалентно связывается со специфической молекулой тРНК, т.е. происходит ковалентное акцептирование аминокислоты. Оба процесса катализируются одним и тем же ферментом, называемым аминоацил-тРНК-синтетазой. Для каждой аминокислоты существует своя специфическая аминоацил-тРНК-синтаза, которая и присоединяет данный аминокислотный остаток к специфическим молекулам тРНК. Молекулы аминоацил-тРНК, образующиеся в результате этих событий, рибосома использует как субстраты для синтеза белка, а *энергия химической связи* между аминокислотным остатком и тРНК используется для образования пептидной связи. Таким образом, процессы активации аминокислот и образования аминоацил-тРНК обеспечивают как материал, так и энергию для синтеза белка.

Используя мРНК как программу и аминоацил-тРНК как высокоэнергетический субстрат, рибосомы переводят (транслируют) генетическую информацию с языка мРНК на язык аминокислот, характерный для полипептидных цепей. В молекулярных терминах это означает, что во время передвижения вдоль цепи мРНК рибосома последовательно выбирает из окружающей среды надлежащие виды аминоацил-тРНК. Специфичность аминокислотного остатка аминоацил-тРНК, выбранной рибосомой, определяется комбинацией нуклеотидов в цепи мРНК, ассоциированной с рибосомой. Это приводит к проблеме генетического кода — комбинаций нуклеотидов, которые определяют (кодируют) каждую из 20 природных аминокислот. Данные комбинации нуклеотидов представляют собой триплеты, называемые *кодонами*.

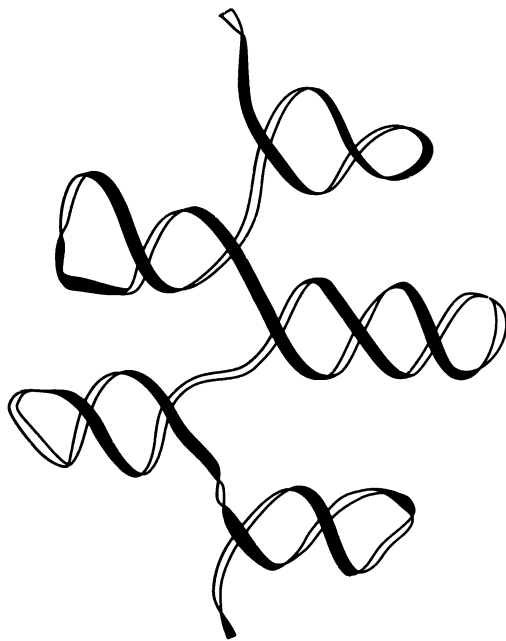
Таким образом, движение рибосомы вдоль цепи мРНК (или перемещение мРНК через рибосому) задает строгий временной порядок вхождения различных видов аминоацил-тРНК в рибосому, который зависит от последовательности кодонов в цепи мРНК. В рибосоме аминокислотный (аминоацильный) остаток каждой выбранной аминоацил-тРНК ковалентно прикрепляется к растущей полипептидной цепи. Деацилированная тРНК освобождается в раствор. В каждом акте выбора аминоацил-тРНК и освобождения деацилированной тРНК рибосома потребляет добавочную энергию, освобождаемую в результате гидролиза ГТФ. Все это приводит к пошаговому формированию полипептидной цепи в соответствии с программой, записанной в цепи мРНК.

1.4. Принципы макромолекулярной структуры РНК

1.4.1. Вторичная структура

Принципиальное макроструктурное различие двух типов нуклеиновых кислот состоит в том, что ДНК — это единая двойная спираль, т.е. макромолекула, построенная из двух комплементарно связанных полимерных тяжей, спирально за-

Рис. 1.6. Схема вторичной структуры РНК, формирующейся за счет парных комплементарных взаимодействий смежных участков полирибонуклеотидной цепи («шпильчатая структура»)



крученных вокруг общей оси, а РНК — однотожевой полимер. В то же время взаимодействия боковых групп — азотистых оснований — друг с другом приводят к тому, что однотожевой полимер РНК сворачивается на себя, формируя вторичную и третичную структуры. Вторичная структура РНК образуется в основном за счет парного взаимодействия смежных участков полинуклеотидной цепи с формированием коротких двуспиральных участков, где спаренные участки цепи имеют противоположную направленность, т.е. «антипараллельны» (рис. 1.6). Это спаривание соседних участков цепи происходит благодаря комплементарным взаимодействиям между основаниями противоположных цепей с образованием, в основном, типичных, или канонических (уотсон-криковских), пар G:C, A:U, C:G и U:A (рис. 1.7).

спаривание соседних участков цепи происходит благодаря комплементарным взаимодействиям между основаниями противоположных цепей с образованием, в основном, типичных, или канонических (уотсон-криковских), пар G:C, A:U, C:G и U:A (рис. 1.7).

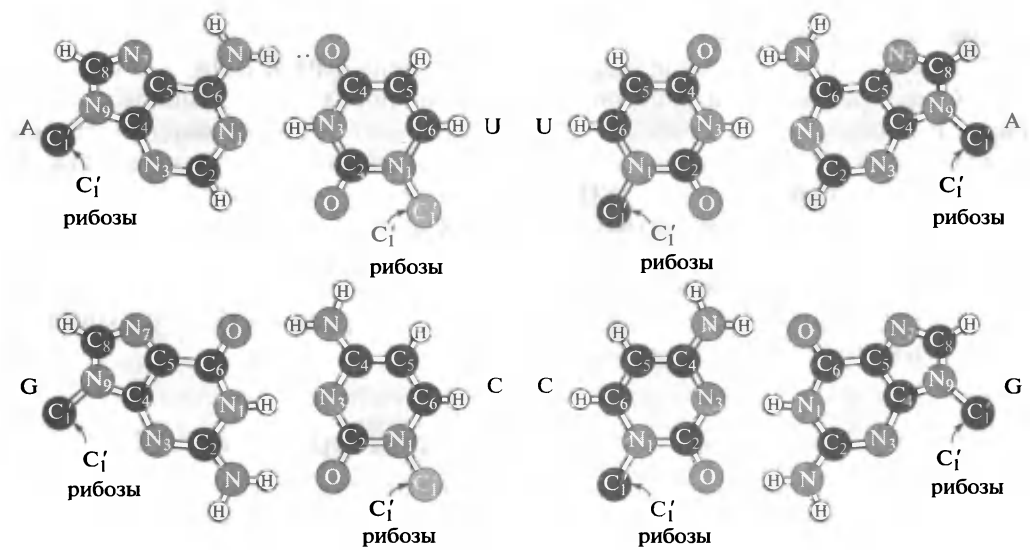


Рис. 1.7. Канонические (уотсон-криковские) пары оснований, идентичные по своим геометрическим параметрам — расстоянию между гликозидными центрами (C_{1'}-атомами рибозы), взаимному расположению гликозидных центров и углу между N-гликозидными связями

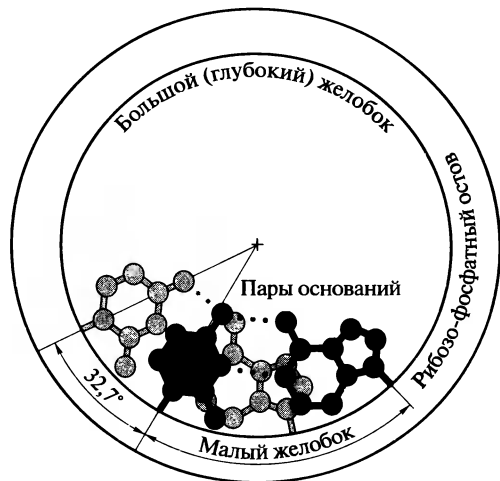
Рис. 1.8. Вид с торца двойной спирали РНК в *A*-форме.

Верхняя пара оснований представлена черными линиями (связи) и кружками (атомы), расположенная под ней пара — серыми. Диаметр двойной спирали 2 нм, шаг спирали 3 нм, расстояние между плоскостями пар оснований вдоль оси спирали 0,27—0,28 нм

Конформация двуспирального участка РНК несколько отличается от классической *B*-формы двойной спирали ДНК; двойная спираль РНК может существовать лишь в *A*-форме, близкой по параметрам к *A*-форме частично обезвоженной ДНК. При диаметре около 2 нм длина полного витка, или шаг, двойной спирали *A*-формы РНК составляет 3 нм (вместо 3,4 нм в *B*-ДНК), расстояние между плоскостями пар оснований вдоль оси спирали — 0,27—0,28 нм (вместо 0,34 нм в *B*-ДНК), и соответственно один виток спирали включает в себя 11 пар оснований (а не 10, как в *B*-ДНК). Главное отличие состоит в том, что пары оснований в двойной спирали *A*-ДНК и РНК сильно сдвинуты от оси к периферии спирали в сторону малого желобка (рис. 1.8), в результате чего малый желобок становится очень мелким, а большой желобок — очень глубоким (ср. *A*- и *B*-формы на рис. 1.1 цв. вкл.).

Другая важная особенность большинства внутрицепочечных двойных спиралей РНК — это формирование некоторого количества неканонических пар оснований — прежде всего пары G:U (U:G), самой близкой к каноническим парам по своим геометрическим (и энергетическим) параметрам (рис. 1.9, вверху слева). Реже встречаются пары, больше отличающиеся от канонических, — G:A (A:G) и U:U, и значительно реже — A:A, A:C и U:C (см. рис. 1.9). Неканонические пары обычно образуются либо на краях двуспиральных участков, либо вписываются в двойную спираль, несколько искажая ее классическую конформацию и дестабилизируя ее. На краях двуспиральных участков и в местах искажений двойной спирали могут формироваться и неканонические пары другого типа, где в спаривании участвуют атомы азота в положении 7 пуринового ядра — так называемые хугстиновские пары оснований (*Hoogsteen base pairs*) (рис. 1.10). Хугстиновские пурин-пуриновые взаимодействия могут иметь место также при внедрении одноцепочечного участка РНК в большой (глубокий) желобок двуспирального участка РНК (см., например, гл. 3, рис. 3.8).

Еще одной особенностью двуспиральных участков РНК является возможность так называемых боковых выпетливаний — участков одноцепочечной РНК, не вписывающихся в двойную спираль и образующих однонуклеотидные выступы, дву-, три- или многонуклеотидные петли с боковой стороны спирали (рис. 1.11). Эти выпетливания искажают конформацию двойной спирали и дестабилизируют ее, но в то же время участвуют в формировании третичных структур РНК. Пример сильного искажения спирали — ее резкого излома — в месте тринуклеотидной боковой петли показан на рис. 1.12.



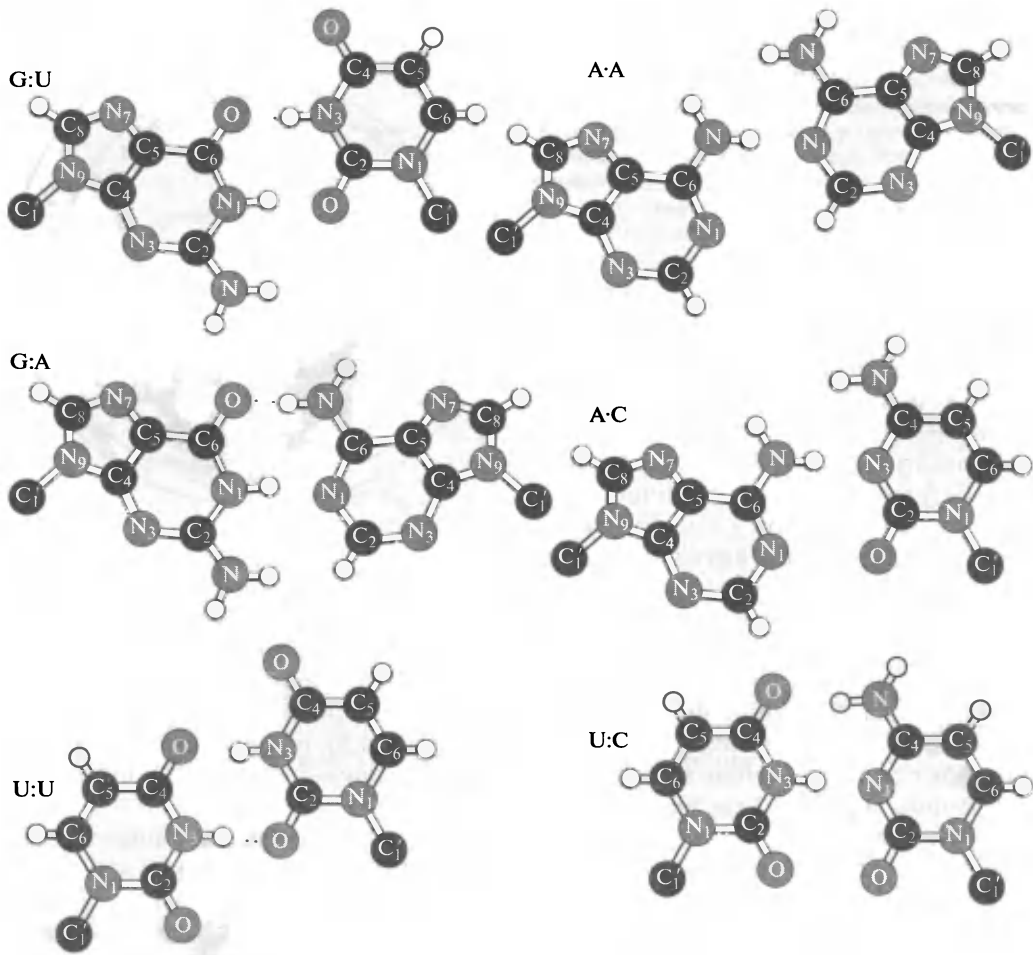


Рис. 1.9. Неканонические пары оснований, встречающиеся в двуспиральных участках РНК. Видно отличие неканонических пар от канонических (см. рис. 1.7) по тем или иным геометрическим параметрам

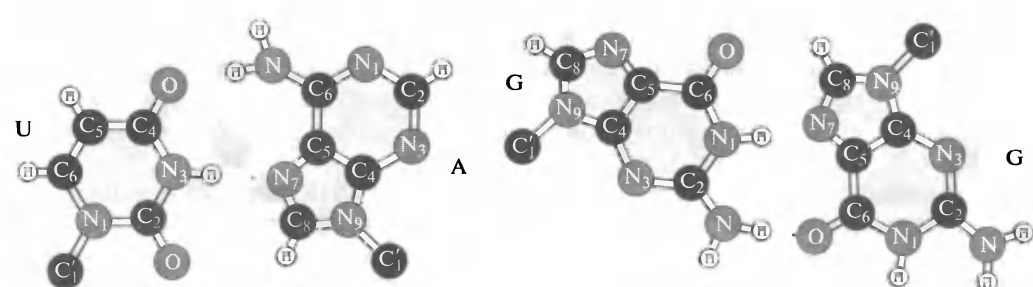


Рис. 1.10. Редкие неканонические пары оснований с участием N₇ пуринового кольца (хугстиновские пары), встречающиеся на торцах двуспиральных участков РНК и при вхождении одноцепочечного участка РНК в большой (глубокий) желобок двуспирального участка

Рис. 1.11. Схема двуспирального участка РНК («шпильки») с боковыми петлями.
Слева — трехнуклеотидная петля (AAA), справа — однонуклеотидный выступ (A)

Торцевые петли двуспиральных участков РНК представляют особый интерес, так как могут формировать специальные типы вторичных структур. Это, прежде всего, так называемые «тетрапетли» (*tetraloops*). На примере, представленном на рис. 1.13, показано, как тетрануклеотидная торцевая петля шпильки образует компактную стабильную структуру: U_5 спаривается с G_8 , тем самым продолжая спиральный участок, C_7 накладывается на торец спирали таким образом, что его азотистое основание находится в стэкинге с парой $U:G$, а U_6 оказывается на самой верхушке шпильки. Подобные тетрапетли вносят большой вклад в стабилизацию двуспиральной структуры соответствующих шпилек. Совсем другого типа структуры часто формируются в гепта- и октануклеотидных торцевых петлях, особенно если такие последовательности начинаются с пиримидиновых нуклеотидов и кончаются пуриновыми (хотя последнее не обязательно). В подобных случаях 5'-половина торцевой петли формируется вытянутым, чаще всего динуклеотидным, отрезком с основаниями, обращенными внутрь, а 3'-половина — остальной частью петлевой последовательности, все или часть оснований которой находятся в плотном стэкинге, образуя фрагмент одноцепочечной спирали с геометрическими параметрами цепи А-формы двуспиральной РНК. Важно, что в указанной структуре азотистые основания срединных нуклеотидов

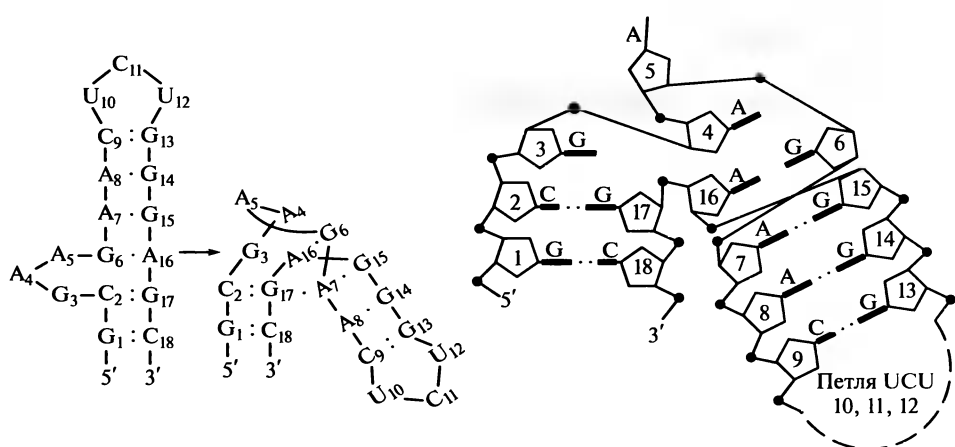
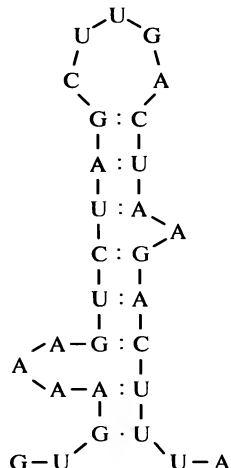


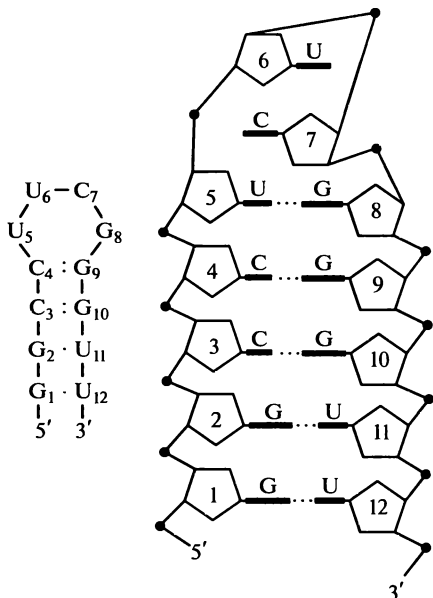
Рис. 1.12. Схема резкого излома двуспирального участка РНК в месте тринуклеотидной петли (GAA).

Видно, что первый нуклеотид петли (G_3) ложится на торец двуспирального участка, предшествующего излому, а второй нуклеотид петли (A_4) — на торец спирали после излома, в то время как третий нуклеотид петли (A_5) оказывается вывернутым наружу. Еще одна особенность излома — пересечение полинуклеотидных цепей 5'- и 3'-ветвей шпильки с образованием сильно искаженных неканонических пар $G_6:A_{16}$ и $A_7:G_{15}$ на торце после излома (детали аналогичного излома см. Klein et al., *EMBO J.* 20: 4214—4221, 2001)

Рис. 1.13. Схема «тетраплетли» UUCG.

Видно, что U_5 формирует неканоническую пару с G_8 , а C_7 ложится на эту пару, в то время как U_6 оказывается на верхушке шпильки.

Varani et al. (1991) *Biochemistry* 30: 3280—3289



петлевой последовательности находятся на «нисходящей» (3') половине петли и обращены наружу, будучи в конформации, готовой для уотсон-криковского взаимодействия с комплементарной последовательностью одноцепочечного участка той же самой или другой РНК. Такого типа структуры гептануклеотидных петель характерны, в частности, для двух шпилек тРНК — антикодоновой (которая взаимодействует с мРНК в рибосоме) и тимидил-псевдоуридиловой, или ТΨ-петли (которая взаимодействует с другой петлей в той же тРНК) (см. гл. 3, рис. 3.5 и 3.7), а также для многих шпилек рибосомных РНК.

Однотяжевая нуклеотидная последовательность торцевой петли шпильки может быть комплементарна однотяжевому участку, примыкающему к шпильке справа или слева, и тогда возможно образование двойной спирали за счет уотсон-криковского взаимодействия между этими участками; в таком случае возникает структура, получившая название «псевдоузел» (*pseudoknot*) (рис. 1.14). В псевдоузле две двойные спирали — спираль шпильки и спираль, образованная за счет взаимодействия торцевой петли с «подножием» шпильки — могут коаксиально стыковаться друг с другом своими открытыми торцами, так что формируется единая составная спираль с однотяжевыми перетяжками между ними, как показано на рисунке.

1.4.2. Третичная структура

Различные взаимодействия между более удаленными участками однотяжевой полинуклеотидной цепи РНК, и в первую очередь взаимодействия между азотистыми основаниями, определяют формирование ее третичной структуры. С другой стороны, РНК представляет собой типичный полиэлектролит с отрицательно заряженными, ионизированными фосфатными группами, обеспечивающими в нейтральной среде один полный отрицательный заряд на каждый мономер цепи. Это должно приводить к сильному электростатическому отталкиванию как вдоль ковалентной цепи полирибонуклеотида, так и между удаленными участками цепи при их пространственном сближении. Действительно, в бессолевой водной среде электростатическое отталкивание фосфатных групп приводит к разрушению как вторичной, так и третичной структур РНК. Поэтому присутствие солей обязательно для формирования пространственных структур полирибонуклеотидов.

В биологических водных средах (как в клетках, так и в бесклеточных условиях) катионы экранируют фосфатные группы — во-первых, за счет прямых ионных

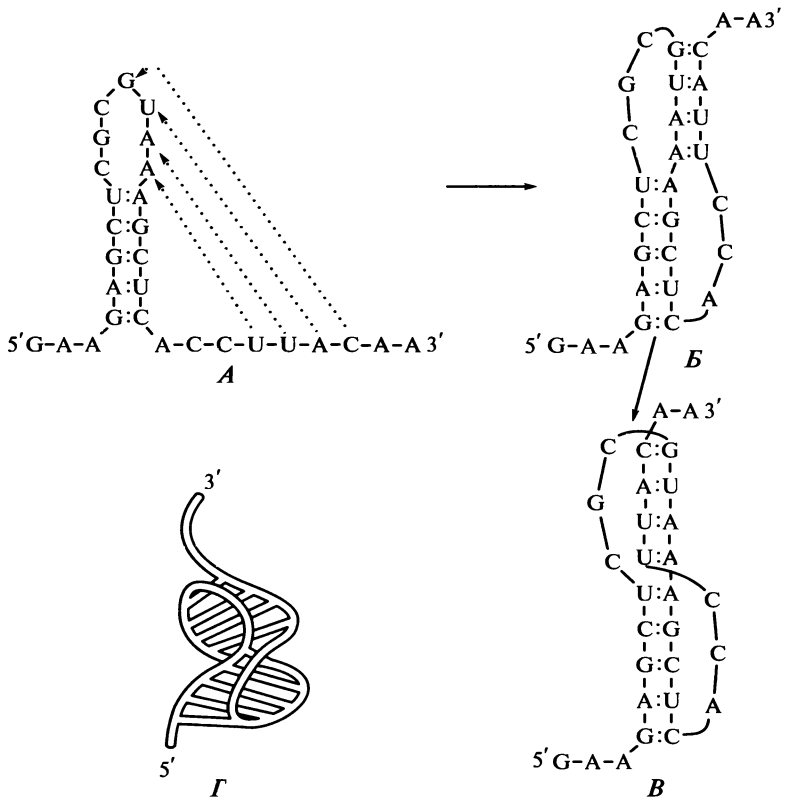


Рис. 1.14. Схема формирования «псевдоузла».

- А:** вторичная структура — шпилька, часть торцевой петли которой комплементарна одноэтажевому участку у основания шпильки.
- Б:** образование двухспирального участка за счет комплементарного взаимодействия одноэтажевого участка у основания шпильки с торцевой петлей шпильки.
- В:** образование составной спирали за счет коаксиального расположения двух спиральных участков, взаимодействующих своими торцами.
- Г:** схема трехмерной структуры образовавшегося псевдоузла с двойной составной спиралью и двумя одноэтажевыми перемычками, пересекающими составную спираль и соединяющими два составляющих двухспиральных участка.

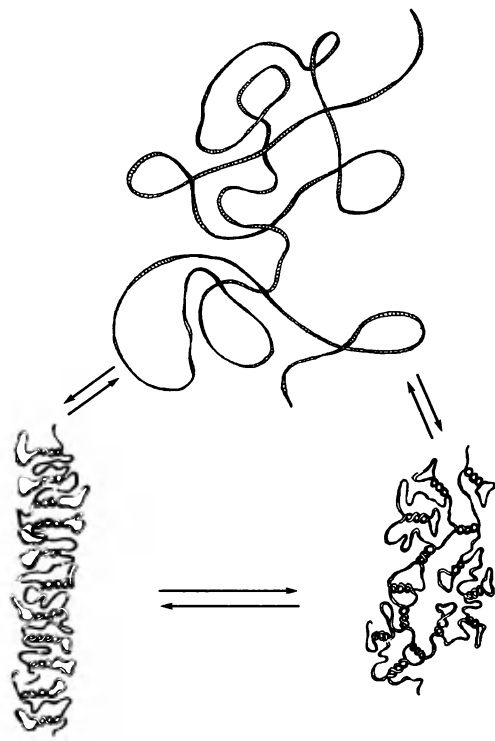
Pleij et al. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**: 1717—1731

связей фосфатов с двухвалентными катионами, главным образом ионами магния (РНК в природе существуют в основном в виде соли Mg^{2+}), и, во-вторых, благодаря образованию вокруг фосфатов противоионного облака одновалентных катионов. В таких условиях эффективное электростатическое отталкивание фосфатных групп полирибонуклеотида подавлено и проявляется положительное взаимодействие между участками цепи — прежде всего, за счет образования водородных связей между азотистыми основаниями и гидрофобных взаимодействий при стэкинге плоскостей колец азотистых оснований, а также за счет образования водородных связей с участием атомов кислорода рибозофосфатного остова и формирования ионных мостиков между фосфатами. Все это приводит к сворачиванию линейного полирибонуклеотида в компактную макромолекулу с вторичной и третичной структурой (рис. 1.15). В бесклеточных условиях обратный процесс — разрушение пространственных структур и разворачивание цепи в тяж —

Рис. 1.15. Конформации и конформационные переходы высокополимерной РНК в зависимости от ионной силы и температуры.

Внизу справа — конформация компактной глобулы.

Spirin (1960) *J. Mol. Biol.* 2: 436—446



можно вызвать деионизацией среды, а также нагреванием, разрушающим в первую очередь водородные связи; гидрофобными агентами, такими как мочеви́на или формамид, ослабляющими гидрофобные взаимодействия; подкислением или подщелачиванием среды, приводящими к ионизации групп, участвующих в образовании водородных связей.

После того как в конце 1950-х — начале 1960-х гг. было экспериментально показано формирование компактных структур молекулами одноцепочечных высокополимерных РНК в надлежащих условиях ионной силы, температуры и рН (Спирин и др., 1959; Спирин, 1960; Киселев и др., 1961; см. рис. 1.15), стало

постепенно утверждаться представление о том, что, подобно сворачиванию полипептидной цепи белка в компактную глобулу со специфической третичной структурой, полирибонуклеотидные последовательности тоже способны сворачиваться в уникальные (специфические для каждой последовательности) третичные структуры. Впервые специфическая пространственная структура РНК была продемонстрирована при расшифровке атомной структуры одной из тРНК в 1974 г. одновременно в группах Клу́га в Англии и Рича в США (см. гл. 3, рис. 3.1 цв. вкл.). Сворачивание полимерной цепи тРНК, состоящей из 76 нуклеотидных мономеров, приводит к формированию очень компактного глобулярного ядра, из которого под прямым углом торчат два выступа. Выступы представляют собой короткие двойные спирали А-формы, одна из которых имеет на верхушке гептануклеотидную петлю для комплементарного взаимодействия с мРНК в рибосоме, а другая заканчивается неспаренной однотяжевой 3'-тетрануклеотидной последовательностью, которая является акцептором аминокислоты и участвует в синтезе полипептидной цепи белка на той же рибосоме (см. гл. 3, рис. 3.7).

Следующим важным шагом было электронно-микроскопическое изучение изолированных рибосомных РНК, которое впервые указало на формирование компактных специфических структур из линейных полирибонуклеотидов значительно большего размера — 1500 и 3000 нуклеотидных остатков (Васильев и др., 1978, 1986). Рибосома состоит из двух неравных частей — большой и малой рибосомных субчастиц (субъединиц) (см. гл. 5), каждая субчастица построена в основном из одной высокополимерной РНК и ряда разнообразных рибосомных белков. Длина цепей рибосомных РНК весьма значительна: так, РНК малой суб-

частицы бактериальной рибосомы содержит более 1500 нуклеотидов, а РНК большой субчастицы — около 3000 нуклеотидов. Васильевым с сотрудниками было показано, что изолированные рибосомные РНК, отделенные от их белковых партнеров и полученные в чистом виде, сами способны спонтанно сворачиваться в компактные структуры, по своим размерам и форме похожие на рибосомные субчастицы. Форма большой и малой субчастиц разная, и соответственно различается форма компактно свернутых большой и малой рибосомных РНК (см. гл. 6, рис. 6.4). Таким образом, линейные цепи рибосомной РНК самоорганизуются в специфические пространственные структуры, определяющие размеры, форму и, как было показано позднее (см. гл. 6 и 7), внутреннее устройство рибосомных субчастиц, а следовательно, и всей рибосомы.

В настоящее время, благодаря рентгеноструктурному анализу рибосомной РНК в составе рибосом, а также рентгеноструктурным исследованиям и анализу с помощью ядерного магнитного резонанса различных малых РНК в свободном виде, удается составить довольно полную картину взаимодействий, определяющих компактное сворачивание и третичную структуру РНК. Один из основных вкладов в компактизацию молекулы РНК с уже сформированной «шпильчатой» вторичной структурой вносит образование двуспиральных участков за счет комплементарного или частично комплементарного взаимодействия между удаленными по цепи однотяжевыми участками. Такой тип «сшивания» удаленных участков и, следовательно, компактизации молекулы показан на схеме компактной глобулы РНК (см. рис. 1.15, *B*). В тРНК комплементарное спаривание 5'-концевой и 3'-концевой последовательностей образует «черешок» всей молекулы и, следовательно, играет ключевую роль в компактном сворачивании молекулы (см. гл. 3, рис. 3.6). Подобную же роль играют комплементарные взаимодействия дальних протяженных участков цепей высокополимерных РНК, образующие «черешки», которые подразделяют всю молекулу на домены и способствуют компактизации каждого — например, домены I, II и III в 16S РНК малой рибосомной субчастицы (см. гл. 6, рис. 6.1) или домены I, II, III, IV, V и VI в 23S РНК большой рибосомной субъединицы (см. гл. 6, рис. 6.2). На указанных рисунках можно видеть и ряд двуспиральных участков, образованных менее удаленными (но не смежными) отрезками цепи высокополимерных РНК.

Удаленные по цепи участки РНК могут удерживаться вместе также путем образования так называемых «рибозных застежек», когда водородные связи возникают между атомами кислорода при положении 2 рибозного кольца (2'ОН) двух цепей РНК (при этом, если 2'ОН одной цепи выступает донором Н для 2'ОН другой цепи, то Н последнего может участвовать в образовании дополнительной водородной связи с атомом кислорода при положении 2 пиримидинового кольца противоположной цепи — рис. 1.16). Азотистые основания однотяжевого участка могут также вклиниваться в большой (глубокий) желобок двуспирального участка и завязывать там хугстиновские взаимодействия с парами оснований, тем самым формируя элемент тройной спирали, что реализуется, например, при формировании третичной структуры ядра молекулы тРНК (см. гл. 3, рис. 3.7 и 3.8). Вкладом в третичную структуру можно считать и тенденцию двуспиральных участков к коаксиальному торцевому стыкованию с образованием длинных составных спиралей, классическим примером чего является формирование двух ветвей в третичной структуре тРНК (см. гл. 3, рис. 3.6). Еще один способ межспиральных взаимодействий, наблюдаемый, в частности, в рибосомных РНК, — параллельная или близкая к параллельной упаковка двойных спиралей, которые могут удержи-

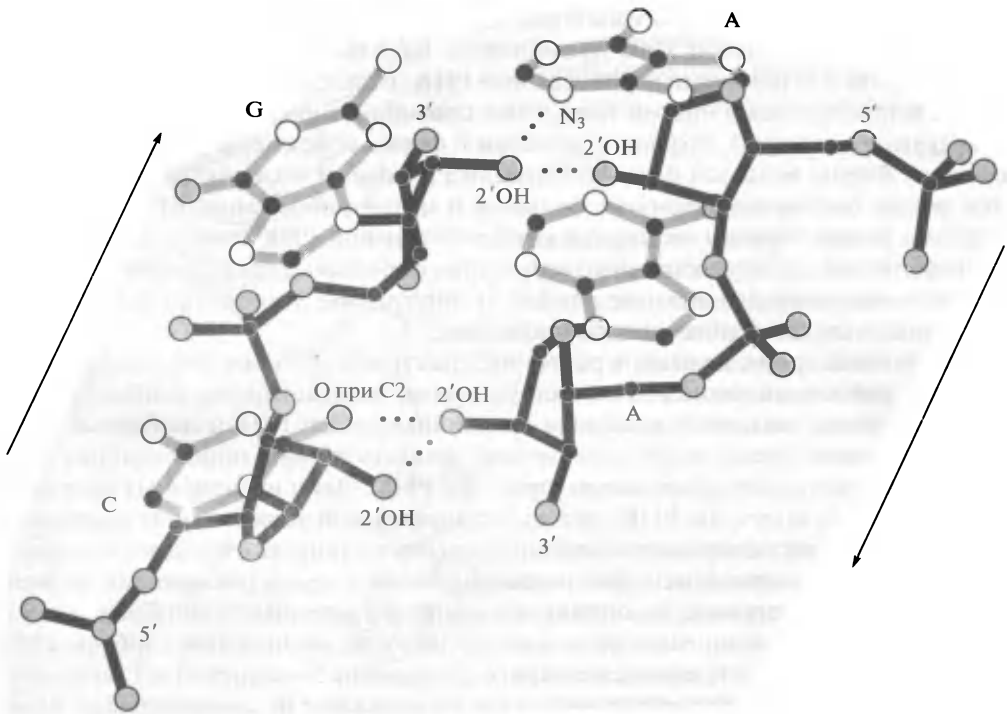


Рис. 1.16. Образование «рибозной застёжки» между удаленными участками полирибонуклеотидной цепи. Водородные связи между 2'О рибозы двух цепей и между 2'О рибозы одной цепи и О при С2 основания другой цепи.

Перерисовано с небольшими изменениями из Cate et al. (1996) *Science* 273: 1678—1685

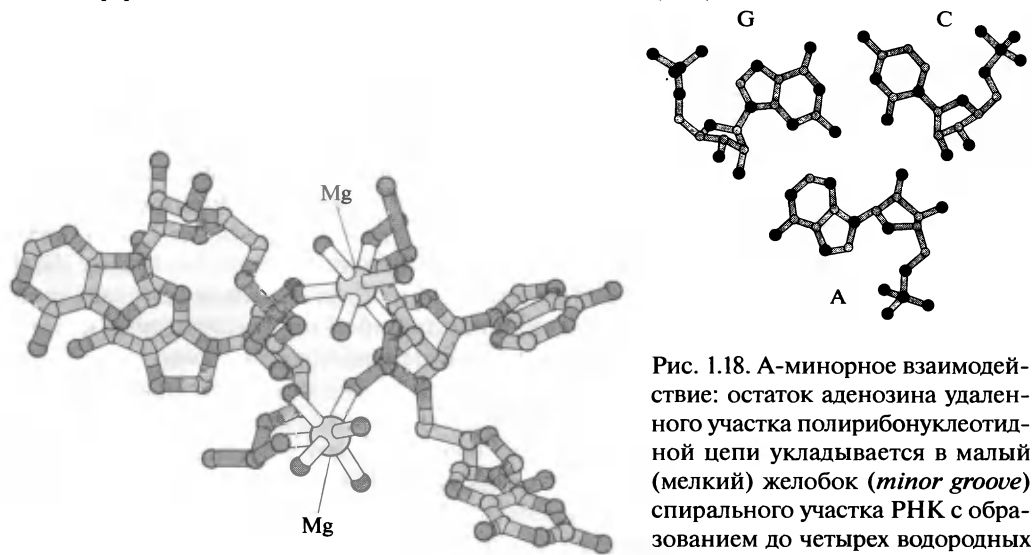


Рис. 1.17. Образование Mg-ионного мостика между удаленными участками полирибонуклеотидной цепи.

Перерисовано с небольшими изменениями из Hansen et al. (2001) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 66: 33—42

Рис. 1.18. А-минорное взаимодействие: остаток аденозина удаленного участка полирибонуклеотидной цепи укладывается в малый (мелкий) желобок (*minor groove*) спирального участка РНК с образованием до четырех водородных связей.

Nissen et al. (2001) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 66: 33—42; (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4899—4903

ваться вместе благодаря Mg^{2+} -мостикам между фосфатными группами двух разных спиралей (рис. 1.17).

Довольно неожиданным было открытие того факта, что после комплементарных взаимодействий наиболее значительный вклад в компактизацию третичной структуры рибосомных РНК вносят взаимодействия адениловых нуклеотидных остатков — одиночных или в виде коротких трактов — с малым (мелким) желобком двуспиральных участков (так называемые А-минорные взаимодействия). Это могут быть адениловые остатки одотяжевых участков, периферически экспонированные аденины, входящие в состав искаженных спиральных участков, адениловые остатки боковых или торцевых петель двуспиральных участков. Дело в том, что аденин представляет собой в некотором смысле уникальное азотистое основание: так как он не имеет боковой группы при углероде в положении 2 кольца основания, ему ничто не мешает хорошо укладываться в малый (мелкий) желобок и близко контактировать с уотсон-криковской пурин-пиримидиновой парой двойной спирали по всей поверхности желобка между рибозными остатками, где располагаются многочисленные электроотрицательные атомы — N3 пуриновых колец, N при C2 гуанина, O при C2 пиримидиновых колец и O 2'-гидроксила (2'ОН) обеих рибоз (см. рис. 1.7 и 1.8). В результате этого адениловый остаток получает возможность образовывать водородные связи с основаниями и рибозными остатками пурин-пиримидиновой пары — например, между N3 своего пуринового кольца и N при C2 гуанина G:C пары, между N1 своего пуринового кольца и 2'ОН рибозы гуанилового остатка G:C пары, и между 2'ОН своей рибозы и O при C₂ цитозина G:C пары, а также дополнительную водородную связь между 2'ОН своей рибозы и 2'ОН рибозы цитидилового остатка G:C пары (рис. 1.18). Значительная насыщенность структурированных РНК — в первую очередь рибосомных РНК — А-минорными контактами различного типа сильно укрепляет как отдельные домены структуры, так и всю третичную структуру в целом.

1.5. Мир РНК и происхождение жизни

Нет никаких сомнений, что в процессе развития органического мира нуклеиновые кислоты играли значительную роль. Однако вряд ли на ранних этапах развития жизни возникли одновременно и РНК, и ДНК. Нам представляется, что возникновение рибонуклеотидов и затем РНК было первичным. ДНК возникла значительно позже и параллельно с усложнением функций и все большей дифференциацией протоплазмы... Создается впечатление, что РНК, связанная с наиболее общими проявлениями жизнедеятельности, сформировалась на более раннем этапе развития жизни, в то время как возникновение ДНК связано с формированием более узких и филогенетически более поздних свойств организмов.

А. Н. Белозерский, 1957

1.5.1. Многофункциональность РНК

Ранее уже указывалось, что долгое время за нуклеиновыми кислотами, и в том числе за РНК, признавались лишь генетические функции. Главная генетическая функция — комплементарная репликация (т.е. репликация через образование

комплементарной полинуклеотидной цепи) при участии катализирующего полимеризацию фермента — безусловная прерогатива ДНК, но она присуща и РНК. Функция воспроизведения своей структуры — репликация РНК на матрице РНК — была продемонстрирована, прежде всего, на примере репликативного цикла ряда РНК-содержащих вирусов (Балтимор и др., 1966; Спигелман и Харуна, 1966).

Такую репликацию РНК, независимую от ДНК и запрещенную в большинстве случаев в циклах нормальных клеток современных организмов, можно рассматривать как реликт, сохранившийся в современном мире благодаря вирусам как реликтовым генетическим агентам, выводящим репликацию и трансляцию из-под контроля клеточной ДНК.

В настоящее время выясняется, что реликтовую репликацию РНК можно обнаружить и в нормальных клетках: многие животные и растения несут гены, кодирующие РНК-зависимые РНК-полимеразы или их гомологи, а недавно открытые регуляторные микроРНК и интерферирующие РНК являются, возможно, их субстратом для комплементарной репликации (см., например, обзор Ahlquist, P., 2002).

Другая генетическая функция — кодирование белков — не требует особых комментариев. РНК (мРНК) кодирует белки не только наравне с ДНК, но именно она непосредственно участвует в процессе декодировки. Таким образом, обе генетические функции ДНК — репликативная и кодирующая — оказываются в равной мере присущи также и РНК.

Если кодирующие функции так или иначе связаны в основном с полинуклеотидами как линейными полимерами, то функции белков главным образом зависят от их трехмерной структуры, т. е. специфически свернутой, по большей части компактной (глобулярной) конформации. Поэтому принципиально важным было установление того факта, что полинуклеотидные цепи РНК, как и полипептидные цепи белков, способны самосворачиваться в компактные структуры (Спирин и др., 1959; Спирин, 1960; Киселев и др., 1961) и что сворачивание приводит к специфическим конформациям молекул РНК (Клуг и др., 1974; Рич и др., 1974; Васильев и др., 1978, 1986). С другой стороны, в развитии современных представлений о функциях РНК решающим было открытие некодирующих РНК. Оказалось, что кодирующие РНК составляют лишь малую долю клеточных РНК, а основная часть РНК представлена некодирующими РНК, куда относятся в первую очередь рибосомные РНК (см. подразд. 1.2). Именно для высокополимерных некодирующих РНК двух рибосомных субъединиц было показано, что их специфическое компактное самосворачивание задает специфическую форму каждой из субъединиц и в конечном счете определяет конформацию рибосомы (см. гл. 6 и 7). Таким образом, РНК, так же как и белки, способны образовывать специфические третичные структуры, т. е. обладают структурной и формообразующей функцией.

Способность РНК к формированию компактных трехмерных структур, как и в случае белков, дает основу для специфического взаимодействия с другими молекулами — как макромолекулами, так и малыми лигандами. Другими словами, для молекул РНК, свернутых в специфическую глобулу и тем самым создающих на своей поверхности уникальный пространственный узор, приходится допустить возможность функции молекулярного узнавания, как и у белков. Пожалуй, первыми известными «узнающими» РНК можно считать тРНК, выполняющие адаптерную роль в биосинтезе белка.

Эти среднего размера компактно свернутые молекулы РНК поочередно и очень избирательно взаимодействуют с рядом макромолекулярных структур в клетке: сначала с аминоацил-тРНК-синтетазой, связанной с аминоациладенилатом как активированной формой аминокислоты (см. гл. 3), затем, уже неся на себе ковалентно присоединенный аминоацильный остаток, с фактором элонгации EF1, вместе с которым она поступает в рибосому (см. подразд. 9.2). Хотя на этом пути несомненно реализуются функции специфического узнавания молекулами тРНК других макромолекул, долгое время все же молчаливо принималось, что основную роль здесь играет узнавание тРНК со стороны белков — ферментов, факторов трансляции и рибосомных белков. В 1980-х гг. английским ученым Кандлиффом было впервые заявлено о способности структурированных участков рибосомной РНК специфически узнавать малые лиганды нуклеиновой и небелковой природы. Он представил экспериментальные данные в пользу избирательного взаимодействия (связывания) именно участков свернутой рибосомной РНК, а не рибосомных белков, с рядом антибиотиков рибосомного действия — тиострептоном, эритромицином, аминогликозидами (стрептомицином, канамицином, неомицином).

Через 10 лет были представлены прямые структурные данные о специфическом связывании аминогликозидных антибиотиков с районом малой (16S) рибосомной РНК (Пуглиси и др., 1996). Окончательное признание у РНК самых широких возможностей узнавать другие молекулы и весьма специфично взаимодействовать с ними пришло благодаря аптамерам — небольшим по размерам синтетическим РНК, получаемым путем отбора из многих вариантов нуклеотидных последовательностей с помощью процедур так называемой «бесклеточной эволюции», «эволюции в пробирке» (Эллингтон и Шостак, 1990; Тюрк и Голд, 1990). Оказалось, что можно отобрать и размножить РНК, обладающие способностью избирательно связывать практически любой вид молекул, от низкомолекулярных органических соединений до различных индивидуальных пептидов и белков (см. обзоры: Gold, L., et al., 1995; Puglisi, J. D., and Williamson, J. R., 1999). Другими словами, РНК, как и белки, действительно в полной мере могут обладать функцией специфического молекулярного узнавания.

На способности РНК к специфическому молекулярному узнаванию базируется и их каталитическая функция. Однако на протяжении всей предшествующей истории биохимии утверждалось, что биохимический катализ — «прерогатива» исключительно белков-ферментов. Поэтому и все теории происхождения жизни вынуждены были исходить из первичности белков как макромолекул, абсолютно необходимых для возникновения биохимического метаболизма. Открытие каталитической функции РНК (Чек и др., 1982; Алтман и др., 1983) перевернуло все прежние представления не только об исключительной роли белков в возникновении жизни, но и об их месте в понимании самого явления жизни. По аналогии с белками-ферментами — *энзимами* — каталитические РНК были названы *рибозимами*.

По-видимому, почти все рибозимы, естественно существующие в живой природе в клетках современных организмов, так или иначе участвуют в процессах, связанных с превращениями полинуклеотидных цепей самих РНК. Однако оказалось возможным создавать и искусственные рибозимы с более широким спектром катализируемых реакций (Чек и Голден, 1999). Кроме того, как выясняется из всей совокупности данных по структуре рибосом и особенностям катализируемой рибосомой реакции образования пептидных связей в процессе биосин-

без белка, каталитический центр этой реакции (пептидилтрансферазный центр рибосомы) формируется определенным доменом большой рибосомной РНК, без участия рибосомных белков, т. е. имеет рибозимную природу (Стейтц и др., 2000).

Итак, именно после открытия каталитической функции РНК поменялась парадигма, и взоры биохимиков и молекулярных биологов обратились к РНК как самому «самодостаточному» биополимеру. Действительно, молекулы РНК оказались способны делать все то, что делают белки, — складываться в специфические структуры и определять формообразование биологических частиц, с большой точностью узнавать другие макромолекулы и малые лиганды и взаимодействовать с ними, наконец, осуществлять катализ ковалентных превращений узнаваемых молекул. Таким образом, РНК является уникальным биополимером, которому свойственны как функции ДНК, так и функции белков. Конечно, белки выполняют свои функции более эффективно и разносторонне, чем РНК. Но зато белки в принципе «не умеют» самовоспроизводиться — не существует никаких собственных белковых механизмов для воспроизведения их структуры, кроме как через РНК. В то же время РНК содержит все необходимые структурные предпосылки для точного воспроизведения ее собственной структуры (см. ранее).

1.5.2. Гипотеза о древнем мире РНК

Открытие каталитически активных РНК — рибозимов — в 1982—1983 г. сыграло решающую роль в формулировании и развитии гипотезы о том, что РНК как самодостаточный полимер могла бы и воспроизводиться, и функционировать в глубокой древности на Земле или других космических объектах до появления клеточных форм жизни. Можно предположить, что молекулы РНК могли бы обходиться не только без ДНК как генетического вещества, но и без белков для осуществления катализа важных синтетических и метаболических реакций. Идея древнего *безбелкового мира РНК* как возможного предшественника современной жизни на Земле была окончательно сформулирована в 1986 г. (Гилберт) и быстро приобрела многочисленных сторонников. В настоящее время гипотеза о том, что жизнь начиналась с молекул РНК и их ансамблей, является почти общепринятой (см. сборники «Мир РНК» — «*The RNA World*» — под редакцией Гестеланда, Чека и Аткинса, 1993, 1999 и 2006). Таким образом, термин «мир РНК» широко используется теперь для обозначения древней, пребиотической ситуации на Земле, имевшей место около 4 млрд лет назад, когда самореплицирующиеся молекулы РНК или их ансамбли могли существовать и эволюционировать без белков.

Таким образом, согласно современным представлениям, в древнем мире РНК не было ни белков, ни ДНК, а лишь ансамбли различных молекул РНК, выполнявших разные ранее перечисленные функции. Однако вопрос о возникновении такого мира на Земле — один из самых трудных в теории происхождения жизни. Можно предполагать, что первичные олигорибонуклеотиды возникали из абиогенно образующихся монорибонуклеотидов или их активированных производных путем полимеризации на поверхностях глин и глиноподобных минералов. Возможна была также и предшествующая химическая эволюция нуклеотидоподобных и олигонуклеотидоподобных соединений. В любом случае появление оли-

говерибонуклеотидов должно было стать отправной точкой появления мира РНК. Однако для дальнейшего развития было необходимо, чтобы абиогенный синтез олигорибонуклеотидов, основанный на редких случайных событиях, был дополнен постоянным механизмом, который бы мог генерировать варианты этих олигомеров и удлинять их (при сильной тенденции к их спонтанной химической и физической деструкции).

Элонгация коротких олигорибонуклеотидов в полирибонуклеотиды представляется абсолютно необходимым условием для образования компактно свернутых структур со свойствами специфического узнавания лигандов и каталитическими активностями, а *генерация вариантов* в популяции абиогенных олиго- и полирибонуклеотидов требуется для обеспечения возможности случайного возникновения нужных функциональных, в том числе каталитических, активностей.

В течение долгого времени не было предложено какого-либо удовлетворительного решения этой проблемы. В 1991—1993 гг. Четвериним и Четвериной с сотрудниками был разработан метод молекулярного клонирования РНК: из единичных молекул РНК, помещенных на поверхность геля, содержащего катализатор репликации (в данном случае вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу) и рибонуклеозидтрифосфаты, оказалось возможным выращивать колонии молекул РНК, идентичных исходной молекуле. Позднее метод был применен для регистрации единичных событий, происходящих с популяцией РНК в растворе, и была впервые экспериментально показана способность молекул РНК к спонтанной перестройке их нуклеотидных последовательностей в отсутствие каких-либо ферментов и рибозимов (Четверин и др., 1999). Открытая спонтанная реакция характеризовалась следующими особенностями.

Во-первых, цепи РНК в растворе при температурах от +5 до +37 °С время от времени обменивались частями своих последовательностей; обмен мог осуществляться как между разными молекулами (*транс*-перестройки), так и внутри одной и той же молекулы (*цис*-перестройки).

Во-вторых, эти перестройки были не специфичны по отношению к последовательности и могли происходить в любом месте цепей.

В-третьих, в отличие от рибозимных и ферментативных реакций, а также реакций самокатализируемого сплайсинга, 3'-гидроксилы не участвовали в этой спонтанной реакции, а части РНК реагировали друг с другом внутренними районами.

Реакция оказалась зависима от присутствия Mg^{2+} . Скорость спонтанных перестроек была невысока — одно событие в час на миллиард нуклеотидов; это означает, что 0,002—0,02 % цепей РНК с длиной 800—8000 нуклеотидных остатков спонтанно перестраиваются в популяции РНК в течение 24 часов. Реакция не требует никаких других компонентов, кроме самой РНК и Mg^{2+} , и таким образом может рассматриваться как присущее РНК химическое свойство, проявляющееся повсюду в живой и неживой природе.

Открытие открытия РНК к спонтанным перестройкам, очевидно, имеет прямое отношение к проблеме возникновения древнего мира РНК. Прежде всего, спонтанные перестройки нуклеотидных последовательностей могли быть основным эффективным механизмом непрерывной генерации вариантов олиго- и полирибонуклеотидов до эры рибозимов. Более того, элонгация олигорибонуклеотидов в полирибонуклеотиды путем спонтанной трансэстерификации представляется гораздо более реальной в то время возможностью, чем последовательный

рост цепи, требующий специального механизма, постоянной защиты от деградации удлиняемого полинуклеотида и непрерывного притока энергии. Именно этим путем и могли появляться длинные полирибонуклеотиды на заре возникновения мира РНК.

Появление достаточно длинных полирибонуклеотидов и генерация вариантов за счет спонтанных *цис*- и *транс*-перестроек должны были привести к случайному появлению рибозимов, и критичным должно было стать появление в популяции РНК рибозима, катализирующего процесс комплементарной репликации РНК. Это — принципиальное условие для размножения — амплификации — единичных молекул случайно возникших в популяции вариантов и сохранения их для эволюции.

Другими словами, появление механизмов РНК-катализируемой репликации РНК должно рассматриваться как первое и необходимое условие для начала эволюции мира РНК. В ряде экспериментов была экспериментально показана возможность создания рибозимов, осуществляющих лигирование олигонуклеотидов на комплементарной матрице (Шостак и др., 1989, 1991, 1993) или полимеризующих короткие олигонуклеотиды или мононуклеотиды путем удлинения олигонуклеотидной затравки на комплементарной матрице (Бартел и др., 1993, 1996, 2001).

С появлением таких рибозимов — хотя бы одной молекулы на популяцию молекул РНК в каком-то небольшом водоеме — мир РНК обретал свою сущность как самосохраняющаяся и развивающаяся материя на древней Земле.

1.5.3. Компартиментализация как условие биологической эволюции

Возникновение и существование мира РНК на Земле естественно требовало жидкой водной среды с нейтральным значением pH и растворенными солями одновалентных металлов (в первую очередь K^+ и Na^+) и Mg^{2+} . Скорее всего это были мелкие водоемы и лужи («дарвиновские пруды»), где могли концентрироваться абиогенно возникающие органические вещества; океанские просторы во все не годились для этого. (Впрочем, как полагает большинство геологов и палеонтологов, в то время океаны на Земле, по-видимому, еще и не существовали.)

Присутствие РНК-репликазной активности в водной среде РНК-содержащей лужи или пруда давало эффект амплификации всех олиго- и полирибонуклеотидов этого водоема, т.е. рост общей популяции молекул РНК. Однако на этом этапе еще не могло быть никакого отбора «лучших» и, стало быть, никакой биологической эволюции.

Дело в том, что в таком случае эффективный РНК-реплицирующий рибозим, присутствовавший в луже, одинаково хорошо должен был амплифицировать как редкие молекулы РНК, обладающие какими-либо полезными для популяции свойствами (например, адсорбция из среды или катализ синтеза нужных веществ), так и основную массу неактивных, балластных молекул РНК. Чтобы естественный отбор начал работать, необходима была какая-то форма компартиментализации, обособления отдельных ансамблей РНК, в которых рибозимы и их продукты удерживались бы вместе. Только тогда естественный отбор мог отличить те РНК, чей продукт лучше, и те ансамбли, чьи РНК функционально эффективнее

дополняют друг друга. Лучшие обособленные ансамбли РНК — первозданные особи — должны расти быстрее других, перерастать других, тем самым обеспечивая отбор лучших.

По-видимому, впервые идея «обособления от окружающей среды» как предпосылки для того, чтобы воспроизводящаяся система макромолекул могла эволюционировать, была выдвинута Опариним в 1924 г. В качестве наиболее примитивного способа первичной компартиментализации, которая могла бы осуществляться в присутствии абиогенно возникающих полипептидов и белков, он предложил коацервацию — образование капелек концентрированного золя в разбавленной среде с растворенными макромолекулами. Это было логично в рамках гипотезы Опарина о начале жизни на основе абиогенного синтеза белка (хотя в конце концов ученый мир пришел к пониманию того, что на основе белков без нуклеиновых кислот невозможно создать самовоспроизводящуюся систему). Однако, согласно гипотезе о древнем мире РНК, этот мир был «однополимерным», и по причине отсутствия полипептидов, полисахаридов и других полимеров, способных к коацервации, да еще и в достаточно больших концентрациях, компартиментализация ансамблей РНК в виде коацерватных капель кажется маловероятной. Тем не менее, для того чтобы каждый ансамбль РНК мог существовать как система, наследовать приобретенные признаки, полезные для всей системы, и эволюционировать, его РНК-реплицирующий рибозим, лигандсвязывающие РНК, нуклеотидсинтезирующие рибозимы и продукты синтезов должны быть, очевидно, как-то объединены в пространстве. Поэтому в большинстве теорий происхождения жизни возникновение каких-то примитивных ограничивающих мембран или хотя бы поверхностей раздела фаз постулируется необходимым условием начала эволюции, в том числе эволюции ансамблей РНК. И в этом состоит одна из основных трудностей таких теорий.

Возможна, однако, и очевидная альтернатива обособлению за счет мембран или поверхностей раздела фаз. Как уже указывалось ранее, Четвериним с сотрудниками была экспериментально показана способность молекул РНК формировать молекулярные колонии на гелях или других влажных твердых средах, если на этих средах им предоставлены условия для репликации (рис. 1.19). Смешанные колонии РНК на твердых или полутвердых поверхностях, без каких-либо мембран, и могли быть первыми эволюционирующими бесклеточными ансам-

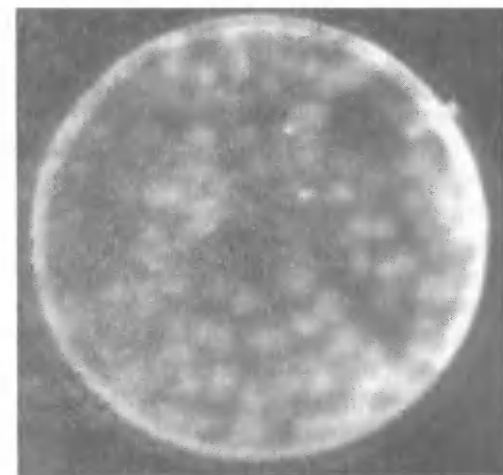


Рис. 1.19. Колонии молекул РНК, выросшие на влажной поверхности агарозы или полиакриламидного геля в присутствии рибонуклеозидтрифосфатов и катализатора комплементарной репликации РНК (РНК-зависимой РНК-полимеразы фага Q β).

Chetverin et al. (1991) *J. Mol. Biol.* **222**: 3–9.
Chetverina and Chetverin (1993) *Nucleic Acids Res.*

21: 2349–2353

блями, где одни молекулы выполняли генетические функции (репликация молекул РНК всего ансамбля), а другие формировали структуры, необходимые для успешного существования (например, адсорбировавшие нужные вещества из окружающей среды), или были рибозимами, ответственными за синтез и подготовку субстратов для синтеза РНК. Такая бесклеточная ситуация создавала условия для очень быстрой эволюции: колонии РНК не были отгорожены от внешней среды и могли легко обмениваться молекулами — своим генетическим материалом. Легкое распространение молекул РНК через среду, в том числе атмосферную, также было продемонстрировано в прямых экспериментах (Четверин и др., 1991).

Эта альтернатива представляется вероятной потому, что образование колоний РНК легко себе представить как естественное следствие подсыхания лужи, населенной молекулами РНК: на влажной поверхности глины, в тех местах, где оказывался РНК-реплицирующий рибозим, молекулы РНК, осевшие на поверхность, должны были амплифицироваться и образовывать колонии — при условии, что необходимые органические вещества (предшественники пуринов, пиримидинов, рибозы и т. д.) и высокоэнергетические фосфаты присутствовали на той же поверхности. Таким путем могли образовываться смешанные колонии РНК с различными функциональными активностями. Подобный ансамбль молекул РНК в виде растущей смешанной колонии мог быть успешным в своем существовании и росте, если он включал в себя лигандсвязывающие РНК для избирательной адсорбции и аккумуляции необходимых веществ из окружающей среды; набор рибозимов, катализирующих метаболические реакции для синтеза нуклеотидов и их активированных (фосфорилированных) производных; рибозим, катализирующий комплементарную репликацию всех РНК колонии.

Наиболее серьезным следствием компартиментализации РНК в форме смешанных колоний было появление механизма естественного отбора: колонии, содержащие РНК, более активные и более подходящие друг другу (функционально дополняющие друг друга), могли расти быстрее, становиться больше и тем самым «перерастать» другие колонии, вытеснять их. Таким образом, образование компартиментализованных ансамблей функционально дополняющих друг друга РНК в качестве особей, способных расти и конкурировать друг с другом, представляется вероятным без окружающих их мембран или оболочек другого типа и даже без четкой границы раздела.

1.5.4. Эволюция древнего мира РНК путем «систематического экспоненциального обогащения»

В 1990 г. одновременно тремя группами ученых в США (Тюрк и Голд; Эллингтон и Шостак; Робертсон и Джойс) была опубликована методология бесклеточной селекции, или бесклеточной эволюции, в пробирке молекул некодирующих РНК, позволившая быстро получать в лаборатории нужные синтетически функционально активные РНК, специфически взаимодействующие с определенными лигандами (аптамеры) или катализирующие определенные химические реакции (искусственные рибозимы), а также совершенствовать функции таких РНК. Оказалось, что эта методология может указать тот путь, которым, возможно, шла естественная эволюция древнего мира РНК. Суть методологии «эволюции в про-

бирке» состоит в многократном чередовании стадий селекции и амплификации РНК («*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*», SELEX). После того как была экспериментально показана возможность существования, роста и амплификации молекул РНК в форме колоний на влажных твердых средах (Четверин и др., 1991, 1993), можно было предположить, что подобное чередование процессов селекции и амплификации могло происходить на первобытной Земле.

Действительно, важным свойством молекулярных колоний РНК является то, что они не имеют никакой ограничивающей их оболочки, удерживающей молекулы внутри компартмента: молекулы РНК удерживаются вместе только благодаря их локализации на твердой поверхности в отсутствие перемешивания и конвекции, типичных для жидкой среды. Это — временное состояние, и любое затопление должно приводить к растворению колоний и перемешиванию всех РНК в общей луже.

Исходя из вышесказанного, можно предложить следующий сценарий «естественного первобытного SELEX'a»).

1. Когда функционально различные молекулы РНК, включая РНК-реплицирующий рибозим, оказываются в одной луже, вся популяция РНК количественно увеличивается, а благодаря реакциям спонтанной трансэстерификации (реакция Четверина) и ошибкам репликации увеличивается и разнообразие молекул.

2. Когда лужа подсыхает, молекулы РНК оказываются на влажной поверхности глины или другого минерального субстрата, и при наличии в данном месте молекулы РНК-реплицирующего рибозима и нескольких других молекул РНК, обеспечивающих связывание нужных веществ и катализ нужных реакций, образует и растет смешанная колония РНК; наиболее успешные колонии (т.е. колонии с наиболее активными и лучше всего дополняющими друг друга молекулами РНК) растут быстрее других.

3. Последующее затопление подсушенного водоема или его части растворяет колонии, и в общем водоеме опять начинается общая амплификация, но уже в популяции, обогащенной «хорошими», т.е. активными и функционально дополняющими друг друга, молекулами.

Таким путем чередующиеся затопления и подсушивания РНК-содержащих водоемов (луж) обеспечивают систематическое обогащение популяции РНК функционально лучшими молекулами («*систематическая эволюция путем экспоненциального обогащения*»). Именно так мог развиваться и эволюционировать древний мир РНК. Две ипостаси этого мира сосуществовали на Земле и переходили друг в друга: коммунальные сообщества размножающихся и разнообразящихся индивидуальных молекул РНК, растворенных в водной среде луж, где реализовывался принцип «от каждого по способностям, каждому по потребностям», и конкурирующих особей в виде смешанных колоний РНК, временно существующих и растущих на влажных поверхностях. Общая гипотетическая картина древнего мира РНК и его эволюции дана на рис. 1.20.

Циклы амплификации-селекции вышеописанного типа могли быть основной формой существования эволюционирующего древнего мира РНК на первобытной Земле. Эволюционный процесс должен был быть исключительно быстрым благодаря трем обстоятельствам. Во-первых, непрерывные спонтанные рекомбинации и перестройки молекул РНК, а также низкая точность примитивных механизмов репликации обеспечивали широчайшее поле вариантов для отбора.

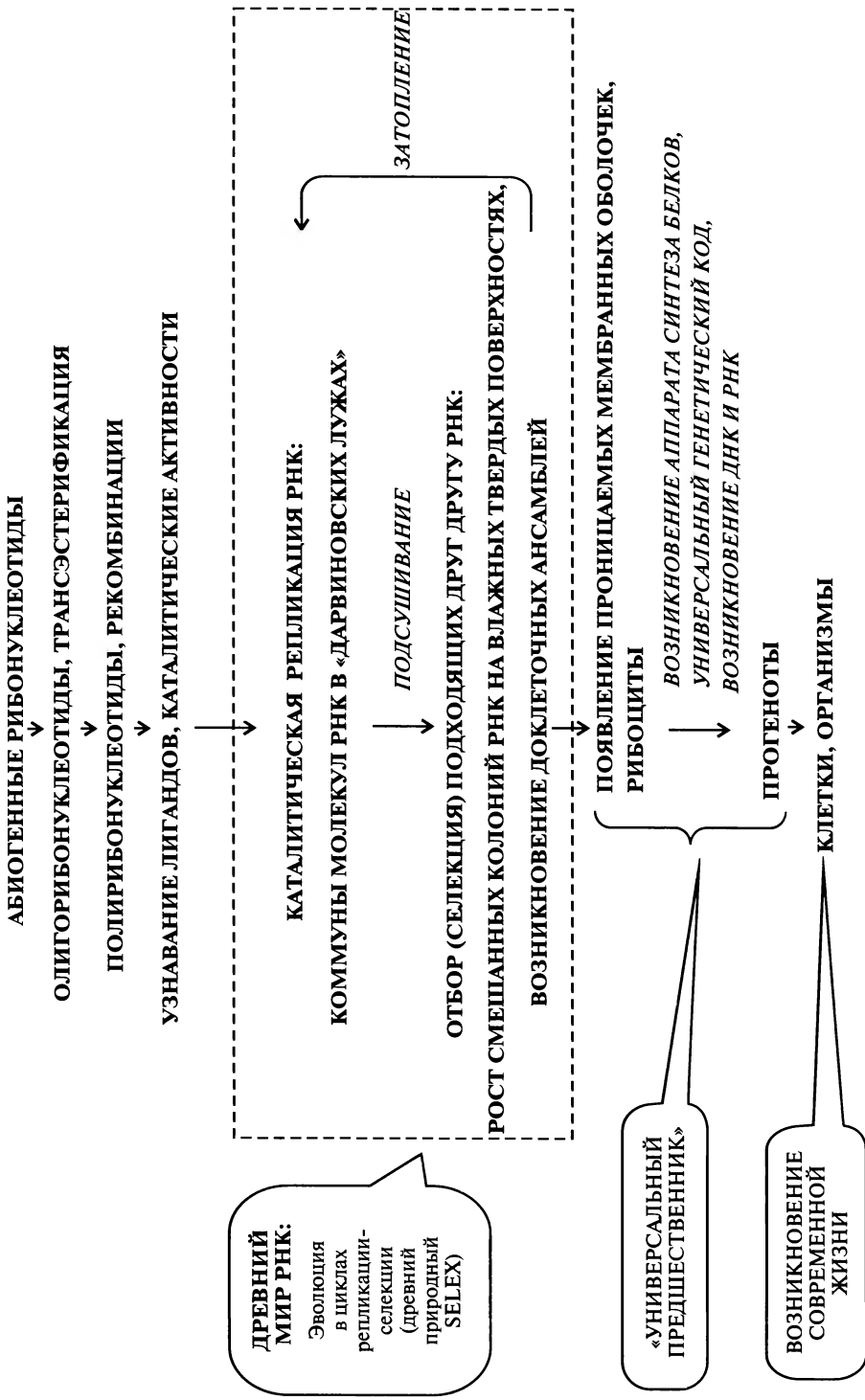


Рис. 1.20. Сценарий возникновения и эволюции мира РНК.

Спирин (2005) *Молекула биология* 39: 550—556

Во-вторых, свободный латеральный перенос и обмен молекулами РНК между колониями через воду и атмосферу делал любые полезные инновации достоянием всех и позволял колониям быстро совершенствоваться в течение короткого времени их существования. В-третьих, экспоненциальное обогащение всей популяции «лучшими» молекулами РНК в циклах амплификации-селекции создавало мощный эволюционный двигатель для всего *коммунального мира РНК* в целом.

В свое время Вуз (1998) выдвинул концепцию «универсального предшественника» живых существ на Земле. Он предположил, что предшественники современных организмов — «прогеноты» — представляли собой примитивных особей, лишенных полноценной внешней мембраны или любого другого барьера, который бы препятствовал свободному обмену генетическим материалом между ними. Они характеризовались высоким уровнем мутаций (ошибок репликации) из-за примитивности и несовершенства механизмов репликации генетического материала и интенсивным латеральным обменом генами и продуктами, когда любые продукты и инновации одних становились достоянием всех. Они существовали как коммуна, и этот коммунальный мир отличался очень высокой скоростью эволюции. Именно такой коммунальный мир «прогенотов», без строго очерченных индивидуальностей, Вуз предложил считать универсальным предшественником всех живых организмов на Земле. В результате эволюционного распада этого единого коммунального мира обособились три главные линии клеточных живых существ, обладающие одинаковым генетическим кодом — кодом своего универсального предшественника: бактерии (эубактерии), археи (археобактерии) и эукарии (эукариоты). В настоящее время, в свете всех данных и представлений о мире РНК, можно предположить, что роль «универсального предшественника» играло коммунальное сообщество колоний-ансамблей РНК, временно существующих на твердых или гелеобразных поверхностях первобытной Земли, не ограниченных физически никакими мембранами и фазовыми разделами и потому свободно обменивающихся как генетическим материалом, так и продуктами катализируемых реакций, а затем растворяющихся в общей коммуне и заново собирающихся в новых комбинациях молекул. Как уже указывалось выше, такая коммуна должна была очень быстро эволюционировать. Во всяком случае, если мир РНК возник и эволюционировал в клеточные формы жизни на Земле, то весь путь эволюции до индивидуальных организмов с клеточной структурой, ДНК и современным аппаратом белкового синтеза должен был быть пройден менее чем 0,5 млрд лет — во временной промежуток между возникновением планеты Земля 4,6 млрд лет назад и появлением на Земле первых клеточных организмов современного типа 3,8 — 3,9 млрд лет назад.

Конечно, вполне вероятной альтернативой этому сценарию может быть космическое происхождение жизни на Земле: примитивные клеточные формы жизни — скорее всего бактерии и/или археи — были занесены на Землю из ближнего или далекого космоса, возможно, как раз в период интенсивной метеоритной бомбардировки между 4,6 и 4 млрд лет назад, а в дальнейшем на Земле происходила лишь их эволюция в высокоразвитые многоклеточные организмы. В настоящее время именно эта точка зрения приобретает все больше сторонников, что, тем не менее, не снимает принципиального вопроса о возникновении клеточной формы жизни из мира РНК, а лишь переносит его на другие космические объекты.

- Спирин, А. С., Белозерский, А. Н., Шугаева, Н. В., и Ванюшин, Б. Ф. (1957). Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий. *Биохимия* **22**: 744—754.
- Спирин, А. С., Гаврилова, Л. П., Бреслер, С. Е. и Мосевичкий, М. И. (1959). Изучение макромолекулярной структуры инфекционной рибонуклеиновой кислоты из вируса табачной мозаики. *Биохимия* **24**: 938—947.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **78**: 137—158.
- Baltimore, D., Girard, M., and Darnell, J. E. (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology* **29**: 179—189.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905—920.
- Bartel, D. P., and Szostak, J. W. (1993). Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science* **261**: 1411—1418.
- Belozersky, A. N., and Spirin, A. S. (1958). A correlation between the compositions of deoxyribonucleic and ribonucleic acids. *Nature* **182**: 111—112.
- Brachet, J. (1941—1942). La detection histochemique et la microdosage des acides pentosenucleiques. *Enzymologia* **10**: 87—96.
- Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* **190**: 576—581.
- Caspersson, T., Landeström-Hyden, H., and Aquilonius, L. (1941). Cytoplasmnukleotide in eiweissproduzierenden Drüsenzellen. *Chromosoma* **2**: 111—131.
- Chargaff, E. (1950). Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* **6**: 201—209.
- Chargaff, E. (1951). Some recent studies on the composition and structure of nucleic acids. *J. Cell. Comp. Physiol.* **38**, Suppl. 1, 41—59.
- Chetverin, A. B., Chetverina, H. V., and Munnishkin, A. V. (1991). On the nature of spontaneous RNA synthesis by Q β replicase. *J. Mol. Biol.* **222**: 3—9.
- Chetverina, H. V., and Chetverin, A. B. (1993). Cloning of RNA molecules in vitro. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2349—2353.
- Chetverina, H. V., Demidenko, A. A., Ugarov, V. I., and Chetverin, A. B. (1999). Spontaneous rearrangements in RNA sequences. *FEBS Letters* **450**: 89—94.
- Crick, F. H. C. (1959). The present position of the coding problem. *Brookhaven Symp. Biol.* **12**: 35—39.
- Doudna, J. A., and Szostak, J. W. (1989). RNA-catalysed synthesis of complementary-strand RNA. *Nature* **339**: 519—522.
- Doudna, J. A., Couture, S., and Szostak, J. W. (1991). A multisubunit ribozyme that is a catalyst of and template for complementary strand RNA synthesis. *Science* **251**: 1605—1608.
- Doudna, J. A., Usman, N., and Szostak, J. W. (1993). Ribosome-catalyzed primer extension by trinucleotides: A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Biochemistry* **32**: 2111—2115.
- Ekland, E. H., and Bartel, D. P. (1996). RNA-catalysed RNA polymerization using nucleoside triphosphates. *Nature* **382**: 373—376.
- Ellington, A., and Szostak, J. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818—822.
- Franklin, R. E., and Gosling, R. G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **171**: 740—741.
- Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C., and Puglisi, J. D. (1996). Structure of the A site of *E. coli* 16S rRNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274**: 1364—1371.
- Gamow, G. (1954). Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures. *Nature* **173**: 318.
- Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**: 618.
- Gros, F., Gilbert, W., Hiatt, H., Kurland, C., Risebrough, R. W., and Watson, J. D.

- (1961). Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Escherichia coli*. *Nature* **190**: 581—585.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., March, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849—857.
- Jacob, F., and Monod, J. (1961). On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**: 193—209.
- Johnston, W.K., Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Glasner, M.E., and Bartel, D.P. (2001). RNA-catalyzed RNA polymerization: Accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**: 1319—1325.
- Hall, B.D., and Spiegelman, S. (1961). Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 137—146.
- Hayashi, M., and Spiegelman, S. (1961). The selective synthesis of informational RNA in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 1564—1580.
- Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C., and Stephenson, M.L. (1957). Intermediate reactions in protein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **24**: 215—216.
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., and others (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* **316**: 1484—1488.
- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H.-J., Seeman, N.C., and Rich, A. (1974). Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**: 435—440.
- Kisselev, N.A., Gavrilova, L.P., and Spirin, A.S. (1961). On configurations of high-polymer ribonucleic acid macromolecules as revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **3**: 778—783.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., and Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**: 147—157.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920—930.
- Ogata, K., and Nohara, H. (1957). The possible role of the ribonucleic acid (RNA) of the pH 5 enzyme in amino acid activation. *Biochim. Biophys. Acta* **25**: 659—660.
- Robertson, D.L., and Joyce, G.F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**: 467—468.
- Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C., and Klug, A. (1974). Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* **250**: 546—551.
- Spiegelman, S. (1961). The relation of informational RNA to DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**: 75—90.
- Spiegelman, S., and Haruna, I. (1966). A rational for an analysis of RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**: 1539—1554.
- Spirin, A.S. (1960). On macromolecular structure of native high-polymer ribonucleic acid in solution. *J. Mol. Biol.* **2**: 436—446.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Science* **249**: 505—510.
- Vasiliev, V.D., Selivanova, O.M., and Koteliansky, V.E. (1978). Specific self-packing of the ribosomal 16S RNA. *FEBS Lett.* **95**: 273—276.
- Volkin, E., and Astrachan, L. (1956). Phosphorus incorporation in *Escherichia coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology* **2**: 149—161.
- Volkin, E., and Astrachan, L. (1956). Intracellular distribution of labeled ribonucleic acid after phage infection of *Escherichia coli*. *Virology* **2**: 433—437.
- Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**: 738—740.
- Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 964—967.
- Wilkins, M.H.F., Stokes, A.R., and Wilson, H.R. (1953). Molecular structure of deoxyribose nucleic acids. *Nature* **171**: 738—740.
- Woese, C.R. (1998). The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6854—6859.

- Белозерский, А. Н. (1957). О видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий. В кн. «*Возникновение жизни на Земле*» (под ред. А. И. Опарина и др.), с. 198 — 205. Изд-во АН СССР, Москва.
- Опарин, А. И. (1924). *Происхождение жизни*. Изд-во «Московский рабочий», Москва.
- Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* **296**: 1270 — 1273.
- Belozersky, A. N., and Spirin, A. S. (1960). Chemistry of the nucleic acids of microorganisms. In: *The Nucleic Acids* (eds. Chargaff, E., and Davidson, J. N.) **3**: 147 — 185. Academic Press, New York.
- Cech, T. R., and Golden, B. L. (1999). Building a catalytic active site using only RNA. In: *The RNA World*, Second Edition (eds. Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F.) pp. 321 — 347. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Cundliffe, E. (1986). Involvement of specific portions of ribosomal RNA in defined ribosomal functions: A study utilizing antibiotics. In: *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (eds. Hardesty, B., and Kramer, G.), pp. 586 — 604. Springer-Verlag, New York.
- Gesteland, R. F., and Atkins, J. F., eds. (1993). *The RNA World*, First Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F., eds. (1999). *The RNA World*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F., eds. (2006). *The RNA World*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., and Yarus, M. (1995). Diversity of oligonucleotide functions. *Ann. Rev. Biochem.* **64**: 763 — 797.
- Puglisi, J. D., and Williamson, J. R. (1999). RNA interaction with small ligands and peptides. In: *The RNA World*, Second Edition (eds. Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F.), pp. 403 — 425. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Vasiliev, V. D., Serdyuk, I. N., Gudkov, A. T., and Spirin, A. S. (1986). Self-organization of ribosomal RNA. In: *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (eds. Hardesty, B., and Kramer, G.) pp. 128 — 142. Springer-Verlag, New York.

2.1. Расшифровка генетического кода

После открытия мРНК (1956—1961) первым шагом было установление кода, с помощью которого аминокислотная последовательность белков записана в нуклеотидной последовательности мРНК и соответственно в нуклеотидной последовательности одной из двух цепей ДНК. Еще до открытия мРНК теоретические соображения привели к предположению, что каждая аминокислота должна кодироваться комбинацией по крайней мере из трех нуклеотидов (Гамов, Рич и Ичас, 1956; см. монографию: Учас, М., 1969, 1971). Действительно, белки состоят из 20 типов природных аминокислот (рис. 2.1), в то время как нуклеиновые кислоты содержат четыре типа нуклеотидных остатков. Очевидно, что один нуклеотид не может кодировать одну аминокислоту (4 нуклеотида против 20 аминокислот). Существует 16 комбинаций по два нуклеотида (дуплетов), однако этого также не достаточно для кодирования 20 аминокислот. Таким образом, минимальное количество нуклеотидных остатков в комбинации, кодирующей одну аминокислоту, должно быть равно трем. Другими словами, аминокислоты должны кодироваться *триплетами нуклеотидов*. Количество возможных триплетов равно 64, что более чем достаточно для кодирования 20 аминокислот. Могло быть два возможных объяснения избыточного количества триплетов: либо лишь 20 триплетов являются «смысловыми», т.е. могут кодировать ту или иную аминокислоту, в то время как оставшиеся 44 являются бессмысленными, либо аминокислоты могут кодироваться более чем одним триплетом, и в этом случае код будет *вырожденным*.

Далее, триплетный код мог бы быть перекрывающимся, когда один и тот же нуклеотид является частью трех сильно перекрывающихся или двух менее перекрывающихся кодирующих триплетов; или же он мог бы быть неперекрывающимся, когда кодирующие триплеты в матричной нуклеиновой кислоте примыкают друг к другу или даже разделены некодирующими нуклеотидами. Многочисленные наблюдения показывали, что точечные мутации (замены единственного нуклеотида в молекуле нуклеиновой кислоты) обычно приводят к изменению лишь одной аминокислоты в соответствующем белке. Это было свидетельством против идеи о перекрывающемся коде. Более того, перекрывающийся код неизбежно привел бы к ограничениям в возможных соседях данного аминокислотного остатка, т.е. к ситуации, которая никогда не наблюдалась в реальных аминокислотных последовательностях белков. Таким образом, *неперекрывающийся* код казался более вероятным.

Наконец, необходимо было решить вопрос, разделены ли кодирующие триплеты некодирующими остатками («запятыми»), или они считываются вдоль цепи без «знаков препинания»; другими словами, *содержит код «запятые»* или нет. В случае если код не имеет «запятых», возникает проблема рамки считывания матричной нуклеиновой кислоты: только точное, происходящее триплет за триплетом считывание, начинающееся от фиксированной точки в полинуклеотидной

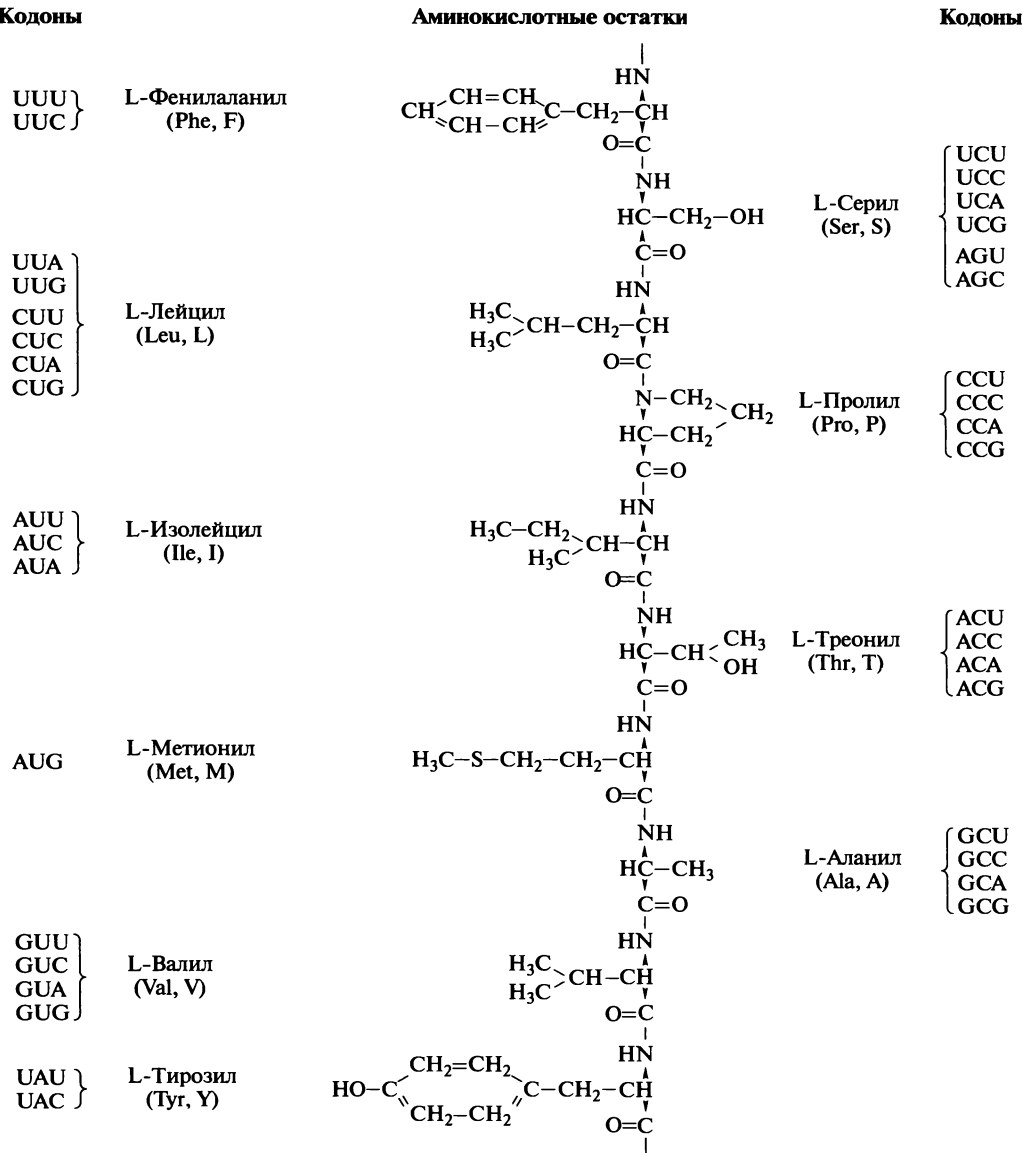
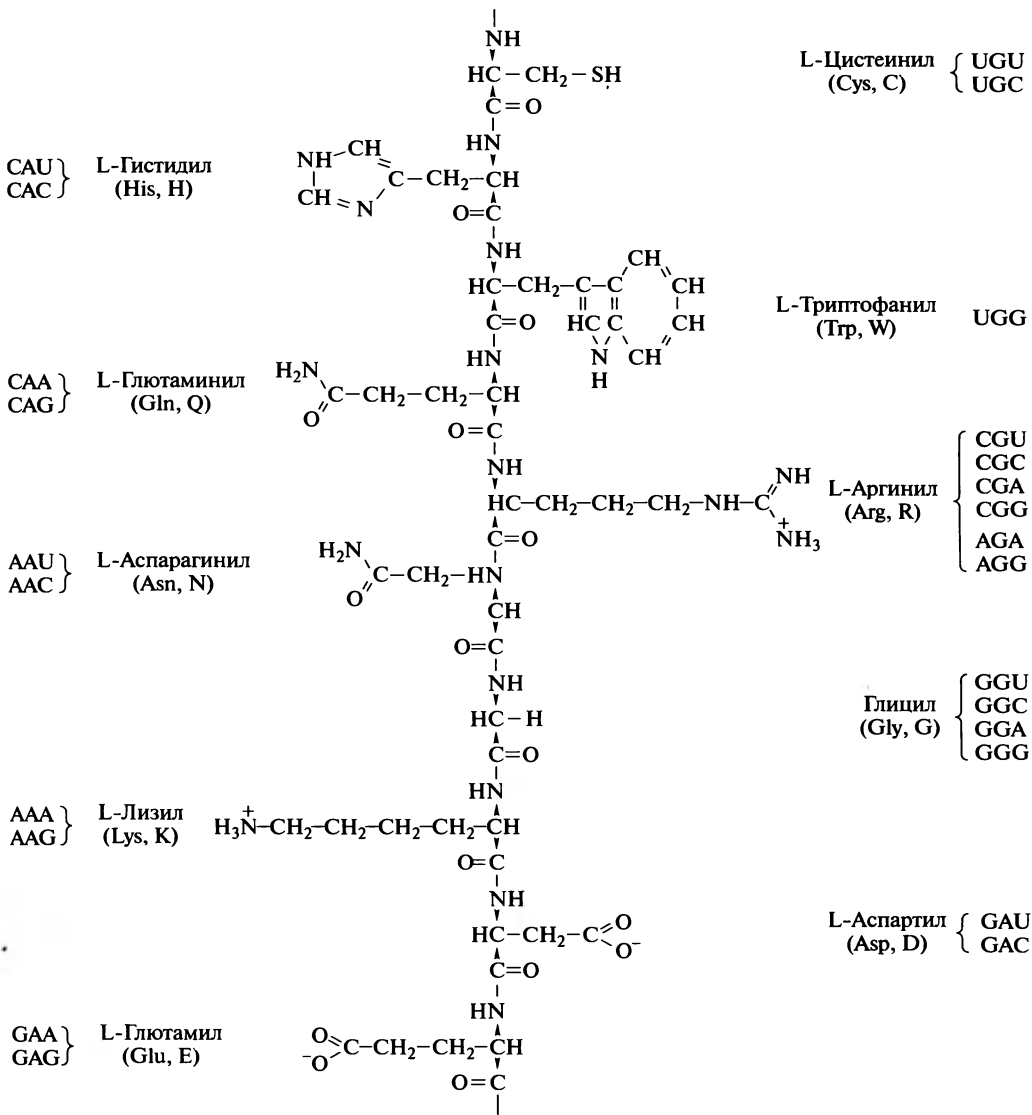


Рис. 2.1. Аминокислотные остатки природных белков, их

цепи, могло бы привести к формированию правильной аминокислотной последовательности.

Классические эксперименты Крика, Бреннера и соавторов, опубликованные в конце 1961 г., установили, что код является триплетным, вырожденным, непрерывным и не содержит «запятых». В этих экспериментах с использованием химических агентов (профлавина и других акридиновых красителей), которые приводили к вставке или делеции одного нуклеотидного остатка во время репликации ДНК, были получены многочисленные мутанты гена *B* в области *rII* бактериофага Т4. Вставки или делеции нуклеотидов поблизости от начала гена приводили к утрате экспрессии гена. Путем рекомбинации различных мутантных



сокращенные обозначения, однобуквенные символы и кодоны

фагов в *E. coli* были получены фенотипические ревертанты, у которых вновь происходила нормальная экспрессия гена. Анализ ревертантов показал, что экспрессия гена восстанавливалась в том случае, если область с делецией была расположена вблизи области со вставкой, или наоборот. Экспрессия гена могла быть восстановлена и в том случае, если две дополнительные вставки (у мутантов со вставкой) или две дополнительные делеции (у мутантов с делецией) вводились поблизости от области с начальной вставкой или соответственно делецией. На основании этих данных были сделаны следующие выводы:

1. Вставка или делеция одного нуклеотида в начале кодирующей области приводит к потере всего кодирующего потенциала соответствующего гена, а не к

простой точечной мутации; такая инактивация могла быть результатом сдвига рамки считывания.

2. Делеция (или вставка), расположенная близко к начальной вставке (или соответственно делеции), восстанавливала кодирующий потенциал последовательности, поскольку восстанавливалась первоначальная рамка считывания.

3. Три (но не другое число) расположенных поблизости вставки (или делеции) также восстанавливали начальный кодирующий потенциал нуклеотидной последовательности.

Из результатов описанных экспериментов следовало, что код триплетный и что триплеты считываются последовательно без «запятых», начиная со строго фиксированной точки в одной рамке считывания. Эти эксперименты предоставили также дополнительные свидетельства в пользу вырожденности кода: если бы многие из 64 возможных триплетов были бессмысленны, то существовала бы высокая вероятность появления по крайней мере одного бессмысленного триплета в районе между вставкой и делецией или между тремя вставками, где происходит считывание со сдвигом рамки, что приводило бы к прерыванию синтеза полипептидной цепи.

Расшифровка того, какую аминокислоту кодирует определенный нуклеотидный триплет, также началась в 1961 г., когда Ниренберг и Маттеи исследовали кодирующие свойства синтетических полирибонуклеотидов в бесклеточной системе синтеза белка. Возможность синтеза полирибонуклеотидов различного состава с использованием фермента полинуклеотидфосфорилазы была впервые продемонстрирована несколькими годами раньше Грюнберг-Манаго и Очоа (1955). Состав полирибонуклеотидов, синтезированных в системе, которую они описали, зависел только от набора субстратов — рибонуклеозиддифосфатов; гомополирибонуклеотиды, такие как полиуридиловая кислота, полиадениловая кислота и полицитидиловая кислота, синтезированные из УДФ, АДФ и ЦДФ, соответственно были наиболее простыми синтезированными полирибонуклеотидами. Используя полиуридиловую кислоту в качестве полирибонуклеотидной матрицы для рибосом *E. coli*, Ниренберг и Маттеи показали, что эта матрица обеспечивает синтез полифенилаланина. Был сделан вывод, что триплет UUU кодирует фенилаланин. Подобным образом эксперименты с полиадениловой и полицитидиловой кислотами показали, что AAA кодирует лизин, а CCC — пролин.

Дальнейшая расшифровка генетического кода основывалась на использовании синтетических статистических гетерополирибонуклеотидов различного состава, которые были получены путем изменения количества и соотношения нуклеозиддифосфатов в полинуклеотидфосфорилазной реакции (Ниренберг и др., 1963; Очоа и др., 1963). Таким образом было показано, что статистический поли(U,C) полимер обеспечивает включение в полипептидную цепь четырех аминокислот: фенилаланина, лейцина, серина и пролина. Когда отношение U к C в полирибонуклеотиде составляло 1:1, то все четыре аминокислоты в равных пропорциях включались в полипептид. Когда отношение U к C было 5:1, то вероятность включения аминокислот была следующей: Phe > Leu = Ser > Pro. Результаты количественной обработки данных по включению аминокислот свидетельствовали о том, что фенилаланин должен кодироваться триплетами, состоящими из трех U или двух U и одного C. Лейцин и серин должны кодироваться триплетами, состоящими из двух U и одного C или двух C и одного U. Пролин должен кодироваться триплетами, состоящими из трех C или двух C и одного U. Этот подход, однако, мог обеспечить выяснение лишь состава кодирующих триплетов, но не

их нуклеотидной последовательности, поскольку нуклеотидная последовательность использованного матричного полирибонуклеотида была статистической.

Вскоре, благодаря применению Ниренбергом и Ледером (1964) нового метода, были определены нуклеотидные последовательности кодирующих триплетов. Они обнаружили, что индивидуальные тринуклеотиды обладают кодирующими свойствами: после связывания с рибосомой триплеты обеспечивают избирательное взаимодействие с ней определенных видов аминоксил-тРНК. Например, триплеты UUU и UUC стимулировали связывание фенилаланил-тРНК, UCU и UCC — связывание серил-тРНК, CUU и CUC — лейцил-тРНК, а CCU и CCC — пролил-тРНК. В 1964 г. стали доступными методы синтеза тринуклеотидов с желаемой последовательностью. В последующие два года был проверен широкий набор тринуклеотидов, и в результате этого был расшифрован практически весь генетический код (рис. 2.2).

История расшифровки генетического кода завершилась использованием в качестве матриц в бесклеточных системах синтеза белка синтетических полирибонуклеотидов с регулярной нуклеотидной последовательностью. Методы, позволяющие синтезировать регулярные полирибонуклеотиды, были разработаны Хораной с сотрудниками (1966), которые проверили генетический код путем прямого использования этих полирибонуклеотидов в качестве матриц. В полном соответствии с установленным ранее генетическим кодом использование регулярного полирибонуклеотида поли(UC)_n в качестве матрицы приводило к синтезу полипептидов, состоящих из чередующихся остатков серина и лейцина, в то время как регулярный поли(UG)_n обеспечивал синтез регулярного полипептида с

		Вторая буква				
		U	C	A	G	
Первая буква	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Ochre UAG } Amber	UGU } Cys UGC } UGA } Opal UGG } Trp	U C A G
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG } Met	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G
						Третья буква

Рис. 2.2. Таблица генетического кода: триплеты нуклеотидов РНК, кодирующие аминокислотные остатки природных белков.

Crick (1996) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31: 1—9

чередующимися остатками валина и цистеина. Регулярный поли(AAG)_n обеспечивал синтез трех гомополимеров: полилизина, полиаргинина и полиглутаминовой кислоты.

2.2. Особенности генетического кода

Полный словарь генетического кода представлен на рис. 2.2 (см. Крик, 1966). Из 64 триплетов, или кодонов, 61 смысловой, они кодируют 20 аминокислот, входящих в состав природных полипептидов и белков. Три кодона — UAG («янтарт»), UAA («охра») и UGA («опал») — обычно не кодируют аминокислот, и потому иногда называются «бессмысленными». Однако «бессмысленные» кодоны играют важную роль в процессе трансляции, поскольку в мРНК они служат сигналами, обеспечивающими терминацию (прекращение) синтеза полипептидной цепи на рибосоме; в настоящее время они обычно называются *терминирующими кодонами*, или *стоп-кодонами*. В то же время триплет UGA может кодировать 21-ю аминокислоту, входящую в состав некоторых природных белков, — селеноцистеин; это требует присутствия в мРНК дополнительного структурного элемента, либо непосредственно граничащего с UGA со стороны его 3'-конца (в случае прокариот), либо расположенного вне кодирующей последовательности в 3'-проксимальной нетранслируемой области мРНК (у эукариот) (см. подразд. 9.2.2).

Как видно на рис. 2.2, вырожденность кода не распространяется на все 20 аминокислот. Для двух аминокислот (метионина и триптофана) существует по одному кодону (AUG и UGG соответственно), для трех (лейцина, серина и аргинина) — по шесть кодонов, для остальных (за исключением изолейцина) — по два или четыре; только изолейцин кодируется тремя кодонами.

Нужно отметить, что триплеты, кодирующие одну и ту же аминокислоту, различаются в большинстве случаев только третьим основанием. Лишь когда аминокислота кодируется более чем четырьмя кодонами, имеются также различия в первой и второй позициях кодона. Группу из четырех кодонов, различающихся только по третьему нуклеотиду и кодирующих одну и ту же аминокислоту, называют *семейством кодонов*. Генетический код содержит восемь таких семейств — для лейцина, валина, серина, пролина, треонина, аланина, аргинина и глицина.

Код, представленный на рис. 2.2, является универсальным для белоксинтезирующих систем большинства бактерий и для цитоплазматических белоксинтезирующих систем эукариот (за исключением тех, что имеются в органеллах), таких как животные, грибы, растения и простейшие. В то же время в конце 1970-х — начале 1980-х гг. было обнаружено, что универсальность генетического кода не является абсолютной, и возможны некоторые исключения (см. обзор: Watanabe, K., and Osawa, S., 1995). Так, выяснилось, что зубактерии родов *Mycoplasma* и *Spiroplasma* имеют два кодона для триптофана — универсальный UGG и близкий к нему UGA, который является стоп-коконом у других организмов. У одного рода реснитчатых простейших — *Euplotes* — UGA кодирует цистеин. Два других универсальных стоп-кодона, UAA и UAG, кодируют глутамин у некоторых других родов реснитчатых (*Tetrahymena*, *Paramecium*, *Stylonychia*, *Oxytricha*) и, по крайней мере, у одного рода одноклеточных зеленых водорослей (*Acetabularia*). У некоторых дрожжей (*Candida*) кодон лейцина CUG кодирует серин. Известные случаи отклонений от генетического кода суммированы в табл. 2.1. Возможно, в дальнейшем будут открыты дополнительные примеры отклонений от универ-

Отклонения от универсального генетического кода у некоторых эубактерий и простейших (K. Watanabe and S. Osawa, in «tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function» (D. Söell and U. RajBhandary, eds.), ASM Press, Washington DC, 1995)

Организм	UGA (Стоп)	UAA, UAG (Стоп)	CUG (Leu)
Эубактерии:			
<i>Mycoplasma</i>	Trp	—	—
<i>Spiroplasma</i>	Trp	—	—
Дрожжи:			
<i>Candida</i>	—	—	Ser
Инфузории:			
<i>Tetrahymena</i>	—	Gln	—
<i>Paramecium</i>	—	Gln	—
<i>Stylonychia</i>	—	Gln	—
<i>Oxytricha</i>	—	Gln	—
<i>Euplotes</i>	Cys	—	—
Одноклеточные зеленые водоросли:			
<i>Acetabularia</i>	—	Gln	—

сального генетического кода, особенно среди одноклеточных эукариот (простейшие, водоросли и грибы).

Органеллы эукариотических клеток — митохондрии и хлоропласты — обладают собственными белоксинтезирующими системами. Для белоксинтезирующих систем митохондрий животных и грибов также характерен ряд значительных отклонений от универсального кода (табл. 2.2). Триптофан у таких митохондрий кодируется кодонами UGG и UGA; в этом случае UGA не используется как стоп-кодон. В митохондриях всех позвоночных, большинства (но не всех) беспозвоночных и некоторых грибов универсальный кодон для изолейцина AUA кодирует метионин, и, таким образом, метионин кодируется двумя триплетами: универсальным AUG и близким к нему AUA. Триплеты AGA и AGG в митохондриях большей части животных не кодируют аргинин; в митохондриях позвоночных они являются стоп-кодонами и кодируют серин в митохондриях многих беспозвоночных (иглокожие, насекомые, моллюски, круглые и плоские черви). В митохондриях дрожжей (*Saccharomyces*, *Torulopsis*) целое семейство кодонов — CUU, CUC, CUA и CUG — кодирует треонин, а не лейцин, хотя у других грибов, таких как *Neurospora* и *Aspergillus*, эти кодоны, как и в универсальном коде, соответствуют лейцину.

Митохондрический генетический код животных и грибов: отклонения от универсального кода (K. Watanabe and S. Osawa, in «tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function» (D. Söell and U. RajBhandary, eds.), ASM Press, Washington DC, 1995)

Организм	UGA Стоп	AUA Ile	AAA Lys	AGA AGG Arg	CUN Leu	UAA Стоп
Позвоночные	Тгр	Met	—	Стоп	—	—
Оболочечники	Тгр	Met	—	Gly	—	—
Иглокожие	Тгр	—	Asn	Ser	—	—
Членистоногие	Тгр	Met	—	Ser	—	—
Моллюски	Тгр	Met	—	Ser	—	—
Нематоды	Тгр	Met	—	Ser	—	—
Плоские черви	Тгр	—	Asn	Ser	—	Thr?
Кишечнополостные	Тгр	?	?	—	?	?
Дрожжи	Тгр	Met	—	—	Thr	—
Аскомицеты	Тгр	—	—	—	—	—
Простейшие	Тгр	—	—	—	—	—

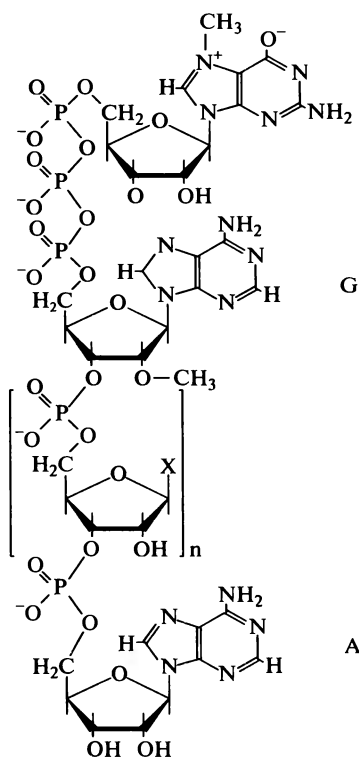
Примечание. ? — неизвестно; — — то же, что в универсальном коде.

2.3. Структура мРНК

2.3.1. Первичная структура и функциональные области цепи мРНК

Молекулы мРНК, как и почти все другие виды клеточной РНК, являются *одноцепочечными* полирибонуклеотидами, в которых четыре типа рибонуклеозидных остатков — аденозина (А), гуанозина (G), цитидина (C) и уридина (U) — последовательно связаны фосфодиэфирными мостиками между 3'-гидроксилом рибозы одного нуклеозида и 5'-гидроксилом рибозы соседнего нуклеозида, образуя линейную неразветвленную цепь. Концевой нуклеозид молекулы РНК, у которого 5'-гидроксил рибозы не участвует в образовании межнуклеотидной связи, называется 5'-концом РНК и у природных прокариотических мРНК всегда фосфорилирован (рис. 2.3) или полифосфорилирован (несет трифосфатную группу), а у эукариот обычно модифицирован специальной группой, называемой *кэп-структурой* (рис. 2.4). Кэп-структура представляет собой N-метилированный остаток гуанозин-5'-трифосфата, связанный с 5'-концевым нуклеозидом 5'-5'-пирофосфатной связью. Нуклеозид, расположенный на другом конце молекулы природной мРНК, имеет свободный 3'-гидроксил рибозы и соответственно обозначается как 3'-конец РНК. Принято писать и читать последовательность нуклеотидов в РНК от 5'-конца к 3'-концу, т.е. по направлению фосфодиэфирной

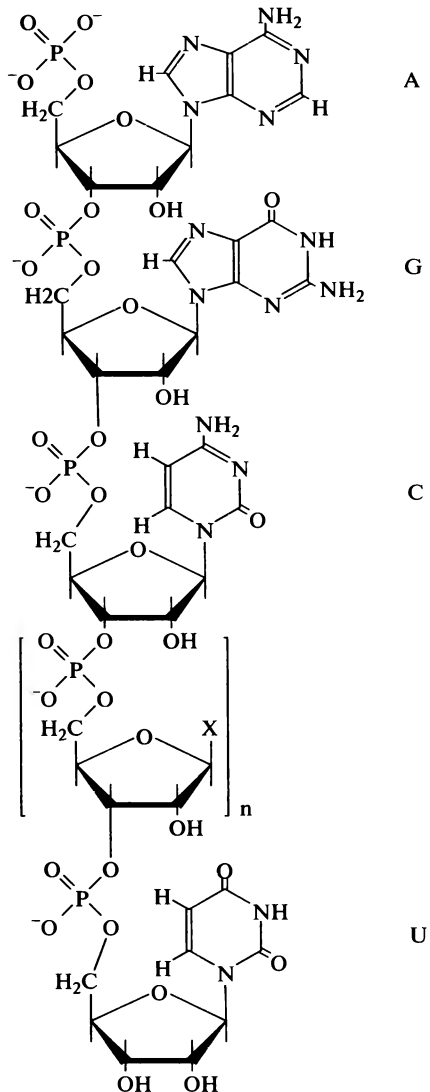
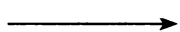
Рис. 2.3. Химическая структура полирибонуклеотидной цепи РНК



Кэп-
структура
(m⁷Gppp)

G

A



A

G

C

U

Рис. 2.4. Химическая структура полирибонуклеотидной цепи эукариотической мРНК с кэп-структурой на 5'-конце

межнуклеотидной связи от 3'-гидроксила к 5'-гидроксила соседнего нуклеотида (3' → P → 5'). Это направление соответствует полярности мРНК, в которой она читается рибосомой.

Длина молекулы природной мРНК всегда больше, чем длина ее кодирующей последовательности, т. е. кодирующая последовательность составляет только часть общей длины мРНК. Первому кодону предшествует не кодирующая (нетранслируемая) 5'-концевая последовательность, называемая 5'-нетранслируемой областью, или 5'-НТО (5'-untranslated region, 5'-UTR), длина которой варьирует у различных мРНК. С другой стороны, терминирующий кодон тоже никогда не располагается на самом 3'-конце, за ним всегда следует не кодирующая 3'-концевая последовательность (3'-НТО, или 3'-UTR). Обе нетранслируемые области особенно важны в случае эукариотических мРНК, где они играют определяющую роль в регуляции трансляции (см. гл. 16). Клетки эукариот обладают специфиче-

ской ферментной системой, в которую входит гуанилилтрансфераза и метилтрансфераза, ответственные за образование кэп-структур на 5'-НТО молекул мРНК («кэпирование»). С другой стороны, в клетках эукариот содержатся активные ядерные и цитоплазматические полиаденилатполимеразы, которые наращивают 3'-концы мРНК длинными последовательностями из остатков адениловой кислоты, формируя на 3'-НТО еще и поли(А)-«хвост», тоже важный для трансляции. Схема расположения вышеперечисленных функциональных областей эукариотической мРНК дана на рис. 2.5.

Важная проблема — идентификация факторов, которые определяют стартовую точку кодирующей нуклеотидной последовательности в цепи мРНК. Известно, что каждый полипептид начинается с N-концевого остатка метионина, и, таким образом, первым в кодирующей последовательности должен быть метиониновый кодон. Действительно, в большинстве случаев роль *инициаторного кодона* играет триплет AUG, но иногда (особенно у прокариот) им может быть GUG или UUG (см. гл. 14). Кодон AUG всегда кодирует метионин — и в том случае, когда он является первым кодоном в цепи мРНК и когда он находится внутри цепи. Однако кодон GUG кодирует валин в случае, если он находится внутри кодирующей последовательности, и стартовый метионин, если расположен на ее старте. То же самое характерно и для кодона UUG, кодирующего лейцин внутри последовательности. В некоторых исключительных случаях AUU или AUA у прокариот и ACG или UUG у эукариот также могут быть инициаторными кодонами для первого метионина цепи. Из вышесказанного очевидно, что идентификация инициаторных кодонов еще не решает проблему стартовой точки кодирующей последовательности. Любой AUG, а тем более GUG или UUG, в цепи мРНК не могут быть инициаторными кодонами. Соответственно трансляция не может быть начата с внутренних триплетов AUG, GUG или UUG кодирующей последовательности, как и с таких триплетов некодирующей части мРНК, независимо от рамки считывания. Таким образом, в отличие от всех других кодонов, и смысловых, и «бессмысленных», выбор данного кодона как точки инициации зависит не только от структуры кодона, т. е. его нуклеотидного состава и последовательности, но также и от положения кодона в цепи мРНК. Определенные дополнительные структурные элементы мРНК обеспечивают возможность данному кодону AUG (или GUG, или UUG) служить инициаторным кодоном. Если быть более точным, то нуклеотидная последовательность, предшествующая инициаторному кодону, а также, возможно, вторичная и третичная структуры данной области мРНК определяют, станет ли соответствующий триплет инициаторным кодоном (см. гл. 14).

Полирибонуклеотидная цепь мРНК не обязательно содержит лишь одну кодирующую последовательность. Одна полинуклеотидная цепь прокариот обычно содержит кодирующие последовательности для нескольких белков. Такие мРНК называют *полицистронными мРНК*. (Этот термин происходит от слова «цистрон», которое Бензер в 1961 г. ввел в качестве эквивалента термина «ген».) Различные

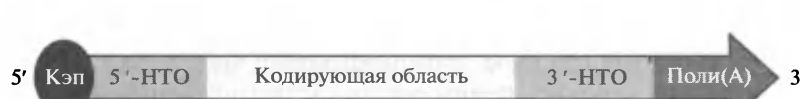


Рис. 2.5. Схема цепи эукариотической мРНК с подразделением на основные функциональные участки

кодирующие последовательности, или цистроны, внутри данной цепи мРНК обычно разделены внутренними некодирующими областями. Такая внутренняя некодирующая последовательность начинается после терминирующего кодона предшествующего цистрона. Следующий цистрон начинается с инициаторного кодона, такого как AUG или GUG.

В отличие от прокариот, мРНК эукариотических организмов являются, как правило, *моноцистронными*, т. е. они кодируют только одну полипептидную цепь. Кодированная последовательность эукариотической мРНК фланкирована на 5'- и 3'-концах некодирующими (нетранслируемыми) последовательностями (5'- и 3'-НТО, или UTR), и 3'-нетранслируемая область является обычно более длинной (иногда даже сравнимой по длине с кодирующей последовательностью). Уже было упомянуто, что в подавляющем большинстве случаев молекула мРНК у эукариот имеет также на 3'-конце поли(А)-«хвост» различной длины, а ее 5'-конец обычно модифицирован кэп-структурой.

Здесь необходимо подчеркнуть, что механизмы, ответственные за поиск инициаторного кодона, в системах трансляции прокариот и эукариот сильно различаются. Рибосомы прокариот образуют комплекс с мРНК и распознают инициаторный кодон независимо от 5'-конца; поэтому они могут инициировать считывание с внутренних участков полицистронной мРНК. В отличие от них рибосомам эукариот для образования комплекса с мРНК чаще всего нужен 5'-конец мРНК, и кэп-структура участвует в процессе первичной ассоциации мРНК с рибосомной частицей (см. гл. 14). У мРНК эукариот первый от 5'-конца кодон AUG обычно служит инициаторным кодоном, хотя есть и многочисленные исключения из этого правила. В то же время РНК многих эукариотических вирусов и некоторые специальные мРНК эукариотических клеток используют альтернативный механизм — внутреннюю инициацию. В случаях внутренней инициации иницирующему кодону (AUG), обычно находящемуся далеко от 5'-конца, предшествует специальный некодирующий участок РНК, называемый «внутренним участком посадки рибосом» (*Internal Ribosome Entry Site*, или IRES) (см. подразд. 14.3.3). У вирусных РНК он во многих случаях представляет собой модуль с развитой третичной структурой, обладающий высоким сродством к рибосомной частице, благодаря чему он способен перехватывать рибосомы у клеточных мРНК. У клеточных мРНК, способных к внутренней инициации, таких сильных модулей не наблюдается, но специальные участки цепи в районе 5'-НТО, связывающие рибосомы независимо от кэп-структуры, могут присутствовать.

2.3.2. Трехмерная структура мРНК

Полная трехмерная структура до сих пор не определена ни для одного вида индивидуальных мРНК. Вместе с тем измерение различных физических параметров нескольких видов мРНК показало, что эти молекулы могут быть сильно свернуты, образуя структуры с большим количеством внутрицепочечных взаимодействий, обусловленных формированием как классических пар водородных связей между основаниями (уотсон-криковские комплементарное спаривание), так и неканонических водородных связей между нуклеотидами, а также других типов взаимодействий, рассмотренных в гл. 1 (подразд. 1.4). Во всяком случае все молекулы мРНК обладают хорошо развитой вторичной структурой. Обычно до 70 % всех нуклеотидных остатков цепи может участвовать в комплементарном спари-

вании и соответственно в образовании внутримолекулярных спиралей. Большая часть двуспиральных областей образуется путем антипараллельного комплементарного спаривания смежных отрезков полинуклеотидной цепи; такие короткие двойные спирали на принятом научном жаргоне называются «шпильками». (Модель формирования таких коротких спиралей — «шпилек» — схематично представлена на рис. 1.6.) Образование вторичной структуры может сопровождаться формированием участков (модулей) с третичной структурой, особенно в районах нетранслируемых областей (5'-НТО и 3'-НТО). Вторичная и третичная структуры мРНК могут играть важную роль в трансляции и ее регуляции. Эта проблема рассмотрена в гл. 15 и 16.

Необходимо подчеркнуть, что после инициации трансляции рибосомы могут читать кодирующую последовательность мРНК более или менее независимо от ее вторичной или даже третичной структуры. Дело в том, что транслирующая рибосома способна последовательно расплетать свернутую цепь мРНК во время движения вдоль нее (естественно, части цепи могут вновь сворачиваться после того, как рибосома перемещается и освобождает соответствующее место). В настоящее время очень мало известно о влиянии вторичной и третичной структур на скорость перемещения рибосом вдоль цепи мРНК и соответственно на скорость синтеза (элонгации) полипептидов. Известно лишь, что эта скорость не постоянна, и вполне может быть, что она зависит от наличия и стабильности вторичной и третичной структур в различных областях мРНК.

Как уже упоминалось, наличие специфической трехмерной структуры РНК вблизи кодона UGA в кодирующей последовательности определяет включение селеноцистеина вместо терминации трансляции (подробнее см. подразд. 9.2.2). Определенные трехмерные структурные мотивы в области кодирующих последовательностей мРНК могут вызвать сдвиг рамки считывания или даже «перепрыгивание» транслирующей рибосомы через больший или меньший участок цепи мРНК в процессе трансляции (см. подразд. 11.4.2 и 11.4.3).

Особое внимание следует обратить на некодирующие последовательности мРНК. Их функция может заключаться в создании специализированных трехмерных (вторичных или третичных) структур, которые контролируют инициацию, элонгацию, иногда терминацию и реинициацию трансляции. У прокариот некодирующие межцистронные вставки влияют на переход рибосом от одного цистрона к другому. У эукариот 5'- и 3'-нетранслируемые области определяют связывание с мРНК специальных белков, которые влияют на трансляцию и могут регулировать консервацию и деградацию мРНК, ее внутриклеточный транспорт и специфическую внутриклеточную локализацию.

2.4. Информационные рибонуклеопротеидные частицы высших эукариот (информосомы, или мРНП)

Комплексы мРНК с белками впервые были обнаружены в цитоплазме эмбриональных клеток животных (Спирин, Белицина и Айтхожин, 1964; Спирин и Немец, 1965). Они были названы *информосомами* и первоначально рассматривались как запасная, или маскированная, форма существования мРНК в половых клетках и ранних эмбрионах. Вскоре после этого, однако, стало ясно, что вся мРНК в цитоплазме клеток эукариот, по крайней мере животных и высших растений, существует в виде таких рибонуклеопротеидов, или мРНП-частиц (Спирин, 1969).

При этом как доступные для трансляции мРНК, так и временно недоступные — репрессированные мРНК (см. подразд. 16.5) и маскированные мРНК (см. подразд. 16.6), обнаруживаются в клетках и клеточных экстрактах в виде аналогичных комплексов с белками (см. обзор: Spirin, A. S., 1996). Более того, анализ транслируемых мРНК в эукариотических полирибосомах также показывает большое количество белка, ассоциированного с мРНК.

Все вышеперечисленные типы цитоплазматических комплексов РНК с белком имеют определенные общие черты. Во-первых, они всегда содержат относительно много белка. В свободных мРНК-частицах (информосомах) соотношение масс белок : РНК обычно составляет около 3 : 1; оно несколько ниже (около 2 : 1) в полирибосомных мРНК, освобожденных от рибосом. (Для сравнения — рибосомы характеризуются соотношением белок : РНК от 1 : 2 у прокариот до 1 : 1 у эукариот.) Во-вторых, поскольку популяция мРНК в клетках, как правило, гетерогенна по размерам (и соответственно коэффициентам седиментации), то и мРНК-частицы в большинстве случаев представляют собой гетерогенно седиментирующую популяцию частиц, коэффициенты седиментации которых определяются размерами мРНК и превышают коэффициенты седиментации соответствующих мРНК в 2,5—3 раза. Обычно в клетках свободные мРНК-частицы седиментируют со скоростями от 20 до 250 ед. Сведберга. Третья общая черта всех цитоплазматических мРНК-частиц состоит в том, что они в отличие от рибосомных частиц достаточно устойчивы к удалению Mg^{2+} . С другой стороны, мРНК в таких частицах, как правило, обладает высокой чувствительностью к эндорибонуклеазам, что может свидетельствовать о ее поверхностном расположении.

Набор белков в мРНК-частицах весьма богат. Большинство белков специфичны к определенным видам мРНК или к их определенному функциональному состоянию, но присутствуют на них в единичных копиях. Эти «минорные» белки пока очень слабо изучены и далеко не все выявлены и идентифицированы. Функции некоторых из них рассмотрены далее (подразд. 16.5 и 16.6). Другие белки мРНК-частиц представлены в виде мажорных компонентов, т. е. находятся в них в большом количестве копий, и универсальны для мРНК. Два семейства таких белков наиболее детально изучены. Одно семейство — это гомологичные белки основного характера с молекулярной массой около 35 кДа, которые обычно обозначают как р50, или белки YB (*Y-box binding proteins*); они обладают высоким сродством к самым различным гетерологичным последовательностям мРНК, но значительно более низким сродством к поли(А)- и поли(С)-участкам. Белки YB — главный белковый компонент мРНК-частиц как по массе и количеству копий на мРНК, так и по своей роли в формировании общей структуры мРНК-частиц. Второе семейство — группа гомологичных белков с молекулярной массой около 70 кДа, обозначаемых как р70, или PABP (*PolyA Binding Protein*); они тоже являются РНК-связывающими белками, но обладают преимущественным сродством к поли(А)-последовательностям и, в первую очередь, к поли(А)-«хвостам» мРНК. PABP связан с поли(А)-«хвостами» транслируемых мРНК в полирибосомах с периодичностью одна молекула PABP на 25—27 адениловых остатков. Поскольку средняя длина поли(А)-«хвоста» транслируемой цитоплазматической мРНК составляет 150—250 адениловых остатков, каждая молекула поли(А)-содержащей мРНК может ассоциировать с 6—10 молекулами PABP.

Значительная нагруженность эукариотической мРНК белками позволяет предполагать, что во взаимодействии мРНК с белоксинтезирующей машиной могут оказаться существенными следующие моменты:

1. Связывание белков может модифицировать, плавить, индуцировать или переключать структурные элементы в мРНК, влияя таким образом на ее трансляционную активность.

2. мРНК-связывающие компоненты, вовлеченные в трансляцию, такие как рибосомы, факторы инициации трансляции, репрессоры и активаторы трансляции, взаимодействуют не просто с голой мРНК, а с мРНК-частицами, и белки мРНК могут оказывать на связывание компонентов трансляции с мРНК либо конкурирующий (антагонистический), либо усиливающий (синергический) эффект.

3. Внутри мРНК-частиц существуют множественные белок-белковые взаимодействия, которые могут обеспечивать дополнительные возможности для трехмерного сворачивания и упаковки мРНК, контролируя доступность мРНК для трансляции, транспортных систем клетки, «якорей» внутриклеточной локализации и возможной ассоциации со структурами цитоскелета.

2.4.1. Особенности структуры белков YB и PABP

Белки YB, или p50 — это семейство ДНК- и РНК-связывающих мультифункциональных белков, участвующих во многих ДНК- и мРНК-зависимых процессах как в ядре, так и в цитоплазме (см. обзоры Овчинников и др., 2001, 2004, 2006). Некоторые члены этого семейства были первоначально обнаружены по их способности специфически связываться с нуклеотидными последовательностями ДНК (*Y-boxes*) в промоторах ряда генов, откуда и происходит название YB (*Y-box binding proteins*). Эти белки с молекулярной массой около 35 кДа имеют аномальную электрофоретическую подвижность, характерную для белков с массой 50 кДа. Как уже указывалось выше, они являются преобладающим компонентом цитоплазматических мРНК-частиц.

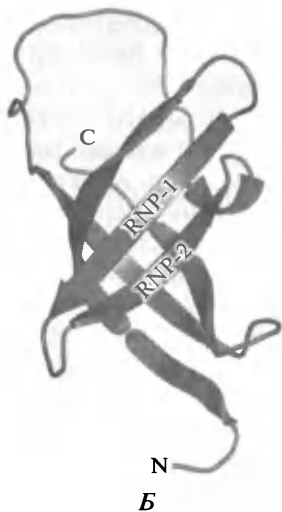
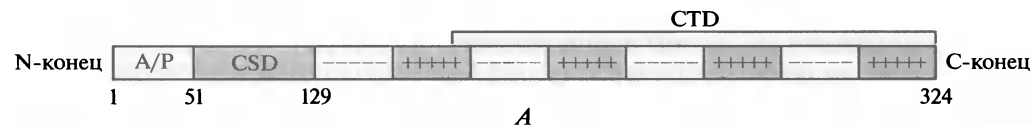


Рис. 2.6. Схема расположения доменов вдоль полипептидной цепи основного мажорного белка YB-1 рибонуклеопротеидных частиц (мРНК) цитоплазмы клеток высших эукариот (А) и пространственная структура так называемого домена холодового шока (CSD) этого белка (Б).

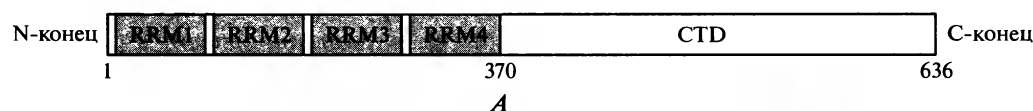
A/P — N-концевой домен, богатый аланином и пролином; CTD — C-концевой домен, богатый заряженными аминокислотами с чередующимися группами отрицательно и положительно заряженных аминокислотных остатков; RNP-1 — Gly-Tyr-Gly-Phe-Ile; RNP-2 — Val-Phe-Val-His.

Protein Data Bank (PDB) ID 1H95. Kloks et al. (2002) *J. Mol. Biol.* **316**: 317–326

Белки YB являются сильно основными, с pI около 9,5, богаты аргинином, а также пролином, глицином и глутамином. В белках YB можно выделить три структурных домена: небольшой N-концевой домен, богатый аланином и пролином (A/P-домен); центральный домен, гомологичный белку холодового шока бактерий (CS-домен, или CSD); C-концевой домен (C-домен, или CTD) с чередующимися кластерами положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, по четыре кластера каждого знака (см. рис. 2.6, **A**; Гилберс и др., 2002). Домен холодового шока (CSD) содержит специфические последовательности — так называемые мотивы RNP-1 (Gly-Тур-Гly-Phe-Ile) и RNP-2 (Val-Phe-Val-His), — расположенные на смежных антипараллельных β -тяжах 2 и 3, образующих единый β -лист, который формирует гидрофобную поверхность, взаимодействующую с РНК (см. рис. 2.6, **Б**). C-домен (CTD) обладает неспецифическим сродством к нуклеиновым кислотам и, как полагают, связывается с отрицательно заряженными фосфатными группами полинуклеотидов своими положительно заряженными кластерами.

В изолированном виде белок YB образует крупные гомомультимерные комплексы с молекулярной массой до 800 кДа и коэффициентом седиментации до 20 ед. Сведберга. Предполагается, что мультимеризация белка происходит в результате взаимодействия друг с другом разноименно заряженных кластеров C-доменов.

Второй мажорный белок мРНК-частиц — PABP — состоит из четырех РНК-связывающих доменов RBD (*RNA Binding Domain*), которые чаще называют РНК-узнающими мотивами, или RRM (*RNA Recognition Motif*), и пролин/глутамин-богатого C-домена (CTD) (рис. 2.7, **A**; см. обзор: Kuhn, U. and Wahle, E., 2004). Каждый домен RRM имеет длину около 80 — 90 аминокислотных остатков и уложен в антипараллельный β -лист, образованный четырьмя β -тяжами, соединенными двумя α -спиралями (см. рис. 2.7, **Б**). Подобно CS-домениу белка YB, RRM белка PABP содержат характерные последовательности RNP-1 и RNP-2 — октамерную Lys/Arg-Gly-Phe/Тур-Gly/Ala-Phe-Val-X-Phe/Тур и гексамерную Leu/Ile-Phe/Тур-Val/Ile-Gly/Lys-Asn/Gly-Leu/Met соответственно, — которые распола-



Б

Рис. 2.7. Схема расположения доменов вдоль полипептидной цепи белка PABP рибонуклеопротеидных частиц (мРНК) цитоплазмы клеток высших эукариот (**A**) и пространственная структура РНК-узнающего домена (RRM) этого белка (**Б**).

RNP-1 — Lys/Arg-Gly-Phe/Тур-Gly/Ala-Phe-Val-X-Phe/Тур;
RNP-2 — Leu/Ile-Phe/Тур-Val/Ile-Gly/Lys-Asn/Gly-Leu/Met.

PDB ID 1CVJ. Deo et al. (1999) *Cell* **98**: 835—845

гаются на $\beta 1$ - и $\beta 3$ -тяжах. В пространстве эти β -тяжи расположены рядом и создают поверхность для связывания РНК — точно так же, как и в случае CS-домена белка YB. Анализ РНК-связывающей активности показал, что ни один из отдельно взятых доменов RRM белка PABP не способен взаимодействовать с поли(А) специфично и эффективно: для эффективного связывания с поли(А) необходима комбинация двух доменов (см. рис. 2.1 цв. вкл.). Два домена вместе (например, RRM1 и RRM2) связывают на внешней поверхности своего объединенного β -слоя участок поли(А) длиной 8 адениловых остатков (Соненберг, Берли и др., 1999). При связывании с длинной последовательностью поли(А) многочисленные молекулы PABP образуют РНП-комплекс, где один протомер белка приходится на 27 нуклеотидных остатков.

Для высокоаффинного связывания PABP с поли(А), так же как и для связывания CS-домена белка YB с РНК, необходимы прежде всего ароматические остатки, находящиеся в мотивах RNP-1 и RNP-2. С-концевой домен PABP не обладает РНК-связывающей активностью, но обеспечивает гомоолигомеризацию PABP. Именно С-домен вместе с RRM3 и RRM4 отвечает за формирование характерного РНП-комплекса на поли(А)-«хвостах» мРНК с многочисленными, регулярно повторяющимися молекулами PABP.

2.4.2. Изменение соотношения двух мажорных белков мРНП, ассоциированных с мРНК, при переходе мРНК из нетранслируемого в транслируемое состояние

В свободных мРНП белок YB является единственным доминирующим белком. Он остается на мРНК в условиях высокой ионной силы, вызывающей диссоциацию большей части остальных (минорных) белков. Таким образом, белок YB является не только мажорным, но и наиболее прочно связанным белком этих частиц. В составе мРНП белок YB более или менее равномерно распределяется по всей длине гетерополимерной части мРНК. В опытах *in vitro* было показано, что этот белок один, без других белков мРНП-частиц, способен образовывать с мРНК комплексы, обладающие характерными структурными свойствами природных мРНП, хотя и менее стабильные по сравнению с последними. Можно думать, что белок YB формирует цитоплазматические мРНП-частицы клеток эукариот аналогично тому, как гистоны формируют ДНП. Роль белка YB может заключаться в структурной организации и неспецифичной (по отношению к нуклеотидной последовательности) упаковке мРНК эукариот в мРНП-частицы.

По сравнению со свободными нетранслируемыми мРНП-частицами мРНП, полученные из полирибосом после диссоциации рибосом, содержат примерно в два раза меньше белка YB на то же весовое количество мРНК и значительно больше белка PABP в качестве второго мажорного белкового компонента. Таким образом, поступление мРНК в полирибосомы сопровождается уходом около половины (или более) белка YB и присоединением PABP к поли(А)-«хвосту» мРНК, который, как правило, наращивается при переходе мРНК в транслируемое состояние. При выходе мРНК из полирибосом наблюдается обратная картина: диссоциация значительной части PABP, сопровождаемая укорочением поли(А)-«хвоста», и присоединение многочисленных дополнительных молекул белка YB по всей длине мРНК.

2.4.3. Влияние белка YB на конформацию мРНК-белковых комплексов

В опытах на модельной системе комплексов YB с мРНК было показано, что при постепенном насыщении мРНК белком меняется как общая конформация комплексов, так и четвертичная структура самого белка YB. При низких соотношениях YB : мРНК исходно мультимерный белок YB мономеризуется и связывается с мРНК обоими РНК-связывающими доменами (CSD и STD-доменом), а комплексы YB с мРНК выглядят как развернутые структуры. При постепенном увеличении соотношения YB : мРНК вплоть до насыщения мРНК белком, что характерно для нетранслируемых свободных мРНП, происходит постепенное вытеснение С-доменов из комплекса с мРНК, которое сопровождается восстановлением мультимерной структуры белка YB за счет взаимодействия друг с другом С-доменов, освободившихся из комплекса с мРНК. В результате этих изменений комплексы мРНК-YB компактизируются. Поскольку мРНК в таких комплексах оказывается чрезвычайно чувствительной к эндорибонуклеазам, можно думать, что она располагается на поверхности мультимеризовавшегося белка. Такие мультимеры YB упаковывают на своей поверхности отрезок мРНК длиной около 600—700 нуклеотидных остатков. В результате этого α -глобиновая мРНК длиной около 660 нуклеотидных остатков размещается на поверхности одной мультимерной белковой глобулы YB, в то время как мРНК вируса табачной мозаики длиной около 6000 нуклеотидных остатков — на 8 глобулах мультимерного белка. В последнем случае образуются структуры, напоминающие плотно упакованные бусины на нити. Коэффициент компактизации мРНК при этом составляет около 5.

Исходя из полученных данных, можно рассчитать, что молекулярная масса белковой глобулы в составе насыщенных комплексов с мРНК составляет около 550—650 кДа. Такая глобула содержит около 15—18 молекул мономерного белка YB. При этом один мономер приходится на сегмент РНК длиной около 40 нуклеотидных остатков. Весьма вероятно, что основные принципы упаковки насыщенных комплексов мРНК с белком YB, выявленные в опытах на модельной системе, соблюдаются и в природных свободных мРНП-частицах (информосомах).

Поскольку полирибосомные мРНП содержат по крайней мере вдвое меньшее количество YB на то же весовое количество мРНК, чем свободные мРНП-частицы, можно считать, что в них одна молекула YB приходится приблизительно на 80 нуклеотидных остатков мРНК. Белок YB в этом случае, скорее всего, связан с мРНК обоими РНК-связывающими доменами и находится в мономерной форме, что обеспечивает развернутую конформацию комплексов, необходимую для сканирования и трансляции мРНК рибосомами.

Следует отметить, что белок YB обладает повышенным сродством к относительно тяжелым участкам РНК, поэтому при связывании с РНК он сдвигает существующее равновесие в сторону плавления двуспиральных участков РНК. При насыщении глобиновой мРНК белком YB наблюдалось плавление до 60 % первоначально имевшейся вторичной структуры мРНК, сопровождавшееся резким повышением чувствительности мРНК к эндорибонуклеазе. Аналогичная РНК-плавящая активность была отмечена и для бактериального белка холодового шока CspA. Приведенные данные позволяют предположить, что частичное плавление вторичной структуры мРНК в комплексе с белком YB вызывается CS-доменом белка.

2.4.4. Роль белков YB и PABP в обеспечении стабильности мРНК

Время жизни мРНК в клетках эукариот определяется как общими, так и специфическими детерминантами стабильности (или нестабильности). Наиболее общими детерминантами стабильности мРНК являются 5'-концевая кэп-структура и 3'-поли(А)-«хвост». Эти элементы вместе с ассоциированными кэп-связывающими белками и PABP обеспечивают базисный уровень стабильности мРНК, предотвращая как 5'-, так и 3'-экзорибонуклеазную деградацию. В большинстве описанных случаев на первом этапе деградации мРНК происходят ее деаденилирование и последующее декэпирование, независимо от наличия других, более специфических дестабилизирующих элементов. По-видимому, деаденилирование является критическим этапом в жизни мРНК, и именно с него начинается переход мРНК в стадию деградации. Удаление PABP из клеточных экстрактов приводит к быстрому деаденилированию и деградации мРНК, тогда как добавление экзогенного PABP восстанавливает стабильность мРНК в таких системах. PABP защищает мРНК от деаденилирования специфической деаденилазой PARN, участвующей в деаденилировании мРНК в клетках млекопитающих.

Длительное хранение мРНК характерно, как правило, для клеток, в которых нет активного белкового синтеза. В этих клетках мРНК не находится в полирибосомах и не ассоциирована с PABP. Маскирование и хранение неактивной мРНК имеет огромное значение, особенно в определенные моменты жизни клетки, когда транскрипционная активность очень низка или отсутствует — например, в ооцитах, в течение длительного времени ожидающих оплодотворения (см. подразд. 16.6), или в соматических клетках в условиях длительного стресса. В таких условиях клетка имеет шанс выжить, если мРНК будет сохранена интактной и компетентной для трансляции. Действительно, показано, что различные вирусные инфекции, ультрафиолетовое облучение, обработка клеток различными препаратами, вызывающими повреждение ДНК, блокирующими транскрипцию и/или трансляцию, вызывают переход мРНК в нетранслируемое состояние и ее стабилизацию.

Поскольку YB является мажорным белком неактивных мРНК, организующим мРНК в компактную структуру, недоступную для компонентов аппарата трансляции, можно ожидать, что именно он принимает участие в стабилизации мРНК. Так как мРНК в комплексе с YB и в природных мРНК обладает высокой чувствительностью к эндорибонуклеазам, стабилизацию мРНК в клеточных лизатах и клетках под действием YB можно объяснить их защитой от декэпирующего фермента и экзорибонуклеаз за счет экранирования обоих концов молекулы мРНК — либо самим белком YB, либо, что более вероятно, привлекаемыми минорными белками РНК-комплекса.

Эмбриональные формы белков YB — главные упаковочные белки маскированных мРНК, хранящихся в половых клетках и зародышах долгое время (см. подразд. 16.6). По-видимому, белок YB вносит значительный вклад в стабильность этих мРНК при длительном хранении. Возможно, что их упаковка в половых и зародышевых клетках эмбриональными формами белков YB принципиально не отличается от упаковки мРНК в соматических клетках, при которой мРНК локализуется на поверхности белковых глобул, и только ее концы становятся недоступными для белоксинтезирующего аппарата, поли(А)-специфических полимераз и нуклеаз, неспецифических экзонуклеаз и других внутриклеточных агентов.

- Спирин, А. С., Белицина, Н. В. и Айтхожин, М. А. (1964). Информационная РНК в раннем эмбриогенезе. *Журнал общей биологии* **25**: 321—338. English translation (1965). Messenger RNA in early embryogenesis. *Fed. Proc.* **24**: T906—T922.
- Benzer, S. (1961). On the topography of the genetic fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 403—415.
- Crick, F. H. G., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature* **253**: 374—375.
- Deo, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N., Burley, S. K. (1999) Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**: 835—845.
- Gamow, G., Rich, A., and Yčas, M. (1956). The problem of information transfer from the nucleic acids to proteins. *Advan. Biol. Med. Phys.* **4**: 23—68.
- Grunberg-Manago, M., and Ochoa, S. (1955). Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: Polynucleotide phosphorylase. *Amer. J. Chem. Soc.* **77**: 3165—3166.
- Khorana, H. G., Buchi, H., Ghosh, H., Gupta, N., Jacob, T. M., Kossel, H., Morgan, R., Narang, S. A., Ohtsuka, E., and Wells, R. D. (1966). Polynucleotide synthesis and genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**: 549—557.
- Kloks, C. P., Spronk, C. A., Lasonder, E., Hoffmann, A., Vuister, G. W., Grzesiek, S. and Hilbers, C. W. (2002). The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J. Mol. Biol.* **316**: 317—326.
- Nirenberg, M. W., Jones, O. W., Leder, P., Clarck, B. F. C., Sly, W. S., and Pestka, S. (1963). On the coding of genetic information. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**: 549—557.
- Nirenberg, M. W., and Leder, P. (1964). RNA codeword and protein synthesis: The effect of trinucleotides upon the binding of sRNA to ribosomes. *Science* **145**: 549—557.
- Nirenberg, M. W., and Mattei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**: 1588—1602.
- Skabkin, M. A., Kiselyova, O. I., Chernov, K. G., Sorokin, A. V., Dubrovin, E. V., Yaminsky, I. V., Vasiliev, V. D., and Ovchinnikov, L. P. (2004). Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res.* **32**: 5621—5635.
- Speyer, J. F., Lengyel, P., Basilio, C., Wahba, A. J., Gardner, R. S., and Ochoa, S. (1963). Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**: 559—567.
- Spirin, A. S. (1969). Informosomes. *Eur. J. Biochem.* **10**: 20—35.
- Spirin, A. S., and Nemer, M. (1965). Messenger RNA in early sea-urchin embryos: cytoplasmic particles. *Science* **150**: 214—217.

Монографии, сборники
и обзоры

- Овчинников, Л. П., Скабкин, М. А., Рузанов, П. В., и Евдокимова, В. М. (2001). Мажорные белки мРНК в структурной организации и функционировании мРНК в клетках эукариот. *Молекул. биол.* **35**: 548—558.
- Скабкин, М. А., Лябин, Д. Н., и Овчинников, Л. П. (2006). Неспецифические и специфические взаимодействия Y-босвязывающего белка I (YB-1) с мРНК и посттранскрипционная регуляция белкового синтеза в животных клетках. *Молекул. биол.* **40**: 620—633.
- Crick, F. H. C. (1958). On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**: 138—163.
- Crick, F. H. G. (1966). The genetic code: Yesterday, today and tomorrow. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**: 1—9.
- Kuhn, U. and Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1678**: 67—84.
- Spirin, A. S. (1996). Masked and translatable messenger ribonucleoproteins in higher eukaryotes. In *Translational Control* (eds.

Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., and Sonenberg, N., eds), pp. 319—334. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Watanabe, K., and Osawa, S. (1955). tRNA sequences and variations in the genetic code. In: *tRNA: Structure, Biosynthesis, and*

Function (eds. Soell, D., and RajBhandary, U. L.), pp. 225—250. ASM Press, Washington, DC.

Үчас, М. (1969). *The Biological Code*. North-Holland Publ. Co.: Amsterdam. Перевод с англ. Ичас М. (1971) *Биологический код*. Изд-во «Мир», Москва.

3.1. Открытие

Информация об аминокислотных последовательностях белков записана в виде нуклеотидных последовательностей мРНК. Триплетный кодон матрицы должен однозначно определять положение соответствующей аминокислоты. Однако между структурой аминокислоты и соответствующего ей кодона нет никакого стерического (пространственного) соответствия. Другими словами, кодоны не могут непосредственно служить матричными поверхностями для аминокислот. Для того чтобы решить эту проблему, Крик в 1957 г. выдвинул «адаптерную гипотезу», в которой он предположил существование специальных малых адаптерных РНК и специализированных ферментов, ковалентно прикрепляющих аминокислотные остатки к этим РНК (см. обзор: Hoagland, M. V., 1960). В соответствии с гипотезой Крика каждый аминокислотный остаток имеет свой собственный вид адаптерной РНК и соответствующий фермент осуществляет прикрепление этой аминокислоты только к данному адаптеру. С другой стороны, адаптерная РНК обладает триплетом нуклеотидов (впоследствии названным *антикодоном*), который комплементарен соответствующему кодону матричной РНК. Таким образом, узнавание кодона аминокислотой осуществляется непрямым способом через систему, состоящую из РНК и фермента: специфический фермент распознает аминокислоту и соответствующую адаптерную молекулу так, что они соединяются друг с другом; в свою очередь адаптер распознает кодон мРНК, и таким образом прикрепленная аминокислота становится специфически приписанной этому кодону. Кроме того, такой механизм подразумевал, что расходы энергии на полимеризацию аминокислот обеспечиваются энергией химической связи между аминокислотным остатком и адаптерной молекулой.

Вскоре предложенная Криком модель была полностью подтверждена экспериментально. В 1957 г. Хоагланд, Замечник и Стефенсон в США и одновременно Огата и Нохара в Японии сообщили об открытии, с одной стороны, РНК с относительной небольшой молекулярной массой («растворимая РНК») и, с другой, специальной ферментной фракции («рН 5 энзим»), которая обеспечивала прикрепление аминокислот к этой РНК. Было продемонстрировано, что образующаяся аминоацил-тРНК действительно является промежуточным соединением — интермедиатом — при переносе аминокислот в полипептидную цепь. Позже эта РНК получила название «РНК-переносчик» (transfer RNA, tRNA), на русский язык не совсем удачно переведенное как «*транспортная РНК*» (тРНК). Ферменты были названы *аминоацил-тРНК-синтетазами* (АРСзамами, или АРС).

Клетки содержат специфические аминоацил-тРНК-синтетазы для каждой из 20 аминокислот, участвующих в синтезе белка (индивидуальные, специфические по отношению к аминокислоте аминоацил-тРНК-синтетазы обозначены ниже, как AlaАРСаза (AlaRS), ArgАРСаза (ArgRS), AspАРСаза (AspRS), и т. д. Таким образом, клетки прокариот содержат 20 различных аминоацил-тРНК-синтетаз. Ситуация с эукариотическими клетками более сложная, поскольку, кроме основных

цитоплазматических синтетаз, имеются свои специфические наборы синтетаз в клеточных органеллах — хлоропластах и митохондриях.

Количество различных видов тРНК всегда больше, чем количество видов аминокислот и аминоацил-тРНК-синтетаз. Например, в *E. coli* обнаружено около 50 видов тРНК, кодируемых различными генами (некоторые виды тРНК кодируются несколькими генами, так что общее количество генов, кодирующих тРНК, достигает 80). Это означает, что несколько различных тРНК могут быть узнаны одной и той же аминоацил-тРНК-синтетазой и соответственно соединяются с одной или той же аминокислотой; такие тРНК называются *изоакцепторными тРНК*. Некоторые изоакцепторные тРНК различаются лишь несколькими нуклеотидами и обладают одним и тем же антикодоном (и, таким образом, распознают один и тот же кодон), но в большинстве случаев различные изоакцепторные тРНК имеют различные антикодоны и узнают различные кодоны, кодирующие данную аминокислоту. У *E. coli* имеется около 40 видов тРНК, несущих различные антикодоны, включая тРНК для селеноцистеина (распознающую UGA) и специальную инициаторную тРНК (имеющую тот же самый антикодон, что и тРНК для метионина). У *E. coli* существует пять различных видов лейциновой тРНК с антикодонами CAG, GAG, U*AG (U* — модифицированный уридин), САА и U*AA, узнающих шесть лейциновых кодонов; среди них тРНК_{1^{Leu}} узнает лейциновый кодон CUG (антикодон CAG), а тРНК_{5^{Leu}} узнает лейциновые кодоны UUA и UUG (антикодон U*AA). Подобная множественность характерна и для тРНК цитоплазмы эукариотических клеток.

Клеточные органеллы (митохондрии и хлоропласты) эукариот содержат свой собственный набор видов тРНК, которые проще, чем тРНК цитоплазмы, и они, как правило, имеют также свои собственные аминоацил-тРНК-синтетазы. Только 22—23 вида тРНК, кодируемых геномом органеллы, могут быть обнаружены в митохондриях животных, и их достаточно для того, чтобы распознать все 62 смысловых кодона митохондриальной мРНК. Таким образом, в органеллах обычно существует единственный вид тРНК, который соответствует каждой аминокислоте и всем кодонам данной аминокислоты. Исключением являются тРНК^{Leu} и тРНК^{Ser}: на два различных семейства кодонов для каждой аминокислоты приходится по два вида тРНК.

3.2. Структура тРНК

3.2.1. Первичная структура

В 1965 г. Холли с сотрудниками сообщили о нуклеотидной последовательности первой молекулы тРНК. Этой молекулой была аланиновая тРНК дрожжей (рис. 3.1). Позже были определены сотни последовательностей различных тРНК из разных источников. Было показано, что все эти структуры имеют ряд общих для тРНК черт. Длина цепей различных тРНК варьирует в довольно узких пределах — от 74 до 95 нуклеотидов (хотя в митохондриях животных ее длина может быть и меньше — до 60 или даже 50 нуклеотидов). В дополнение к четырем основным типам нуклеотидных остатков (А, G, C и U) полинуклеотидная цепь тРНК содержит множество модифицированных нуклеозидов, называемых минорными. Эти нуклеозиды появляются в результате посттранскрипционной модификации

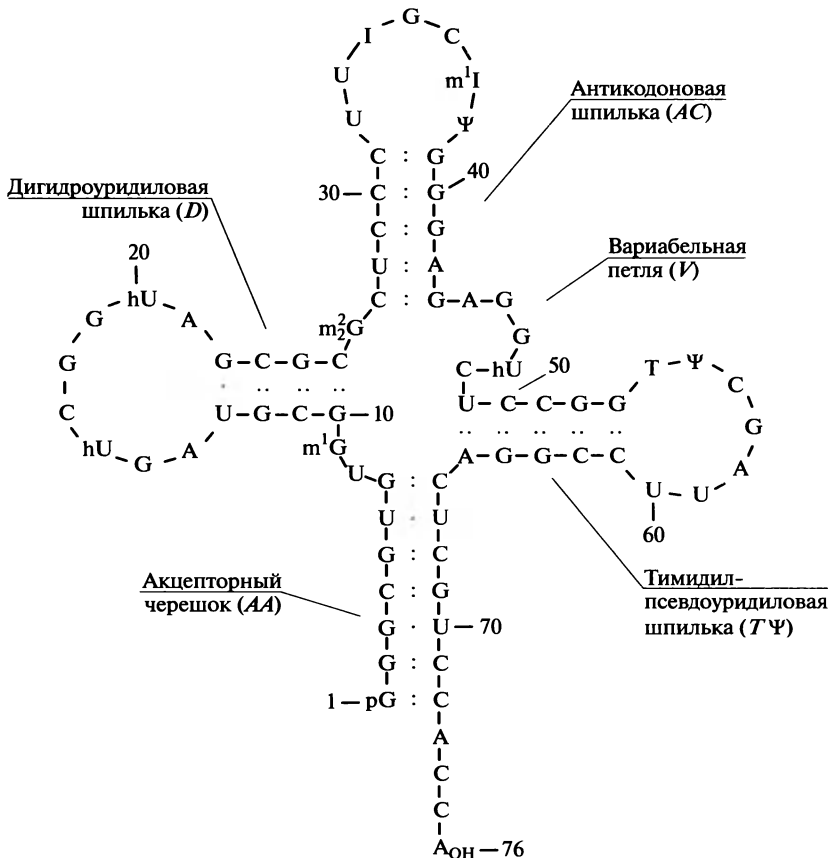


Рис. 3.1. Аланиновая тРНК дрожжей ($tRNA^{Ala}$): нуклеотидная последовательность и схема вторичной структуры в форме «клеверного листа».

Holley et al. (1965) *Science* **147**: 1462–1465

обычных нуклеотидных остатков в определенных позициях полинуклеотидной цепи тРНК. К настоящему времени идентифицировано несколько десятков модифицированных нуклеозидов. Бактериальные тРНК обычно содержат 4-тиоуридин (s^4U) в положении 8; риботимидин (5-метилуридин, T, или m^5U) (рис. 3.2) и псевдоуридин (5-рибофуранозилурацил, Ψ) обнаружены почти во всех тРНК. Почти универсальным минорным остатком тРНК является также 5,6-дигидроуридин (D, или hU). К наиболее распространенным минорным остаткам относятся также метилированные производные обычных нуклеозидов, такие как 1-метилгуанозин (m^1G), N²-метилгуанозин (m^2G), N²,N²-диметилгуанозин (m^2_2G), 7-метилгуанозин (m^7G), 2'-О-метилгуанозин (Gm), 1-метиладенозин (m^1A), 2-метиладенозин (m^2A), N⁶-метиладенозин (m^6A), 2'-О-метиладенозин (Am), 3-метилцитидин (m^3C), 5-метилцитидин (m^5C) и 2'-О-метилцитидин (Cm).

Ряд модифицированных нуклеозидов особенно типичен для антикодоновой области тРНК, расположенной приблизительно в середине цепи молекулы (рис. 3.3 и 3.4). Эти модификации играют, как правило, большую функциональную роль в узнавании молекулами тРНК кодоновых триплетов в мРНК. Типичная модификация аденина тРНК в первом положении антикодонового триплета (положе-

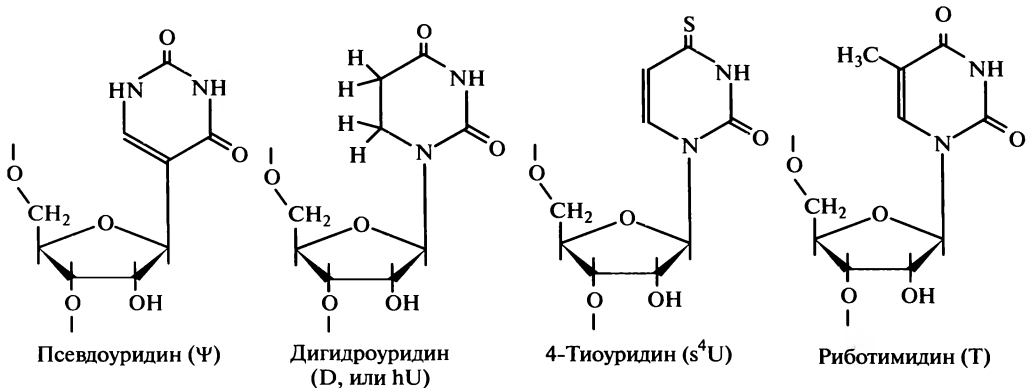


Рис. 3.2. Модифицированные уридиновые нуклеозиды, типичные для тРНК

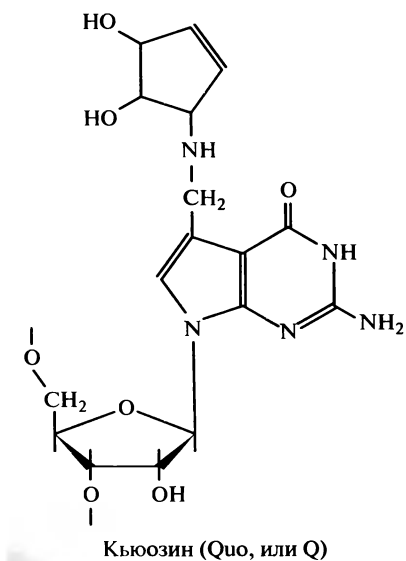


Рис. 3.3. Модифицированные нуклеозиды, типичные для первого положения антикодона тРНК

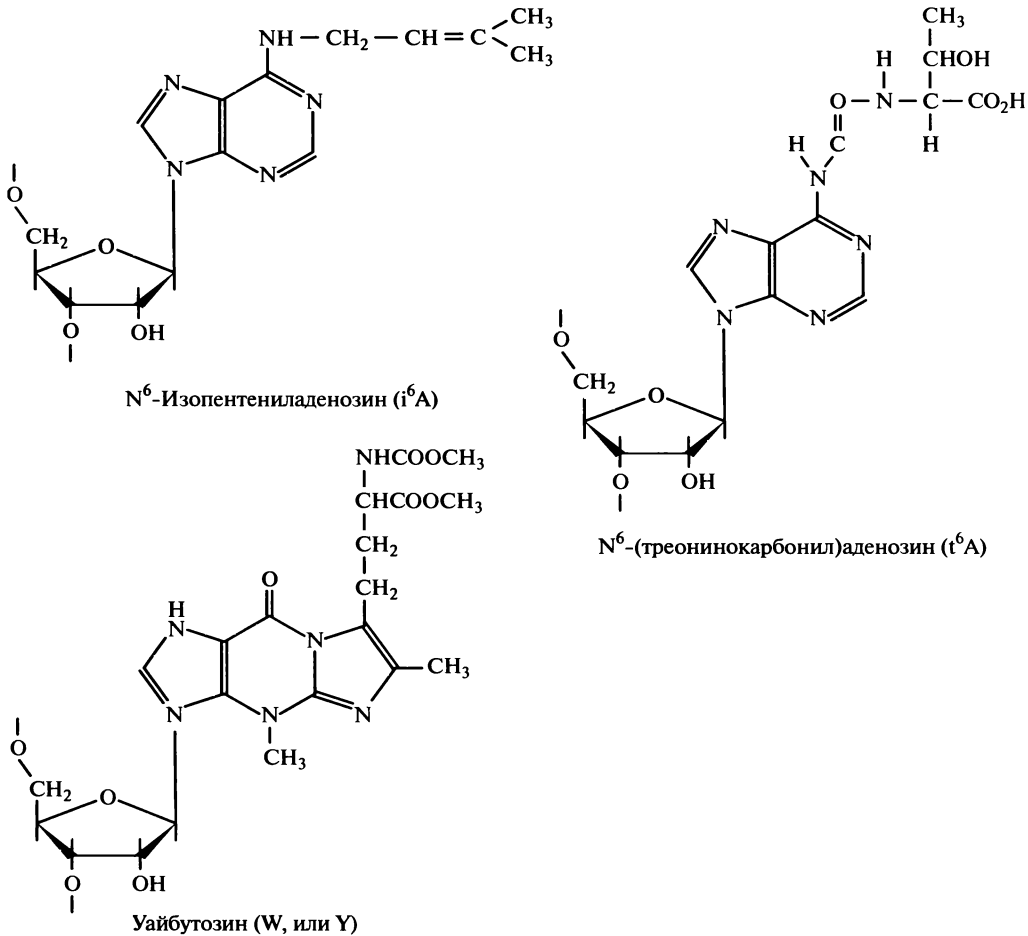


Рис. 3.4. Некоторые гипермодифицированные нуклеозиды, встречающиеся в положении, примыкающем к антикодону тРНК с 3'-стороны

ние 34, см. рис. 3.1) — его окислительное дезаминирование, превращающее аденин в гипоксантин (соответствующий нуклеозид называется инозином и обозначается буквой I — см. рис. 3.3). Немодифицированного аденозина в первом положении антикодона практически не бывает — вместо него присутствует инозин. Инозин (I) особенно характерен для антикодонов эукариотических тРНК, таких как тРНК^{Ile}, тРНК^{Val}, тРНК^{Ser}, тРНК^{Pro}, тРНК^{Thr}, тРНК^{Ala}, тРНК^{Arg}. Исключение составляют митохондриальные тРНК и несколько специальных видов тРНК (см. далее). Урацил (уридин) в первом положении антикодона тоже почти всегда модифицирован, его типичные производные — 5-метоксиуридин (mo⁵U) или 5-карбоксиметоксиуридин (cmo⁵U, или V) в тРНК^{Ala}, тРНК^{Ser} и тРНК^{Val} бактерий (см. рис. 3.3); 5-(метиламинометил)-2-тиоуридин (mnm⁵s²U) в бактериальных тРНК^{Glu} и тРНК^{Lys}; 5-(метоксикарбонилметил)-2-тиоуридин (mcm⁵s²U) в тРНК^{Glu} и тРНК^{Lys} грибов; 5-(метоксикарбонилметил)уридин (mcm⁵U) в тРНК^{Arg} грибов. Присутствие немодифицированного U было продемонстрировано только у одного вида тРНК^{Gly} некоторых бактерий и одного вида дрожжевой тРНК^{Leu}. Немодифицированный U, однако, типичен для митохондриальных тРНК. Гуанозин и

цитозин могут присутствовать в первом положении антикодона в немодифицированном виде, хотя часто тоже модифицированы — обычно метилированы по 2'-гидроксилу рибозы (Gm и Cm). У некоторых тРНК, таких как тРНК^{Asp}, тРНК^{Asn}, тРНК^{His} и тРНК^{Tyr} бактерий и животных, в первом положении антикодона присутствует гипермодифицированное производное G, так называемый кьюзин (Quo, или Q), химическое название которого — 7-[[[(цис-4,5-диокси-2-циклопентен-1ил)амино]метил]-7-дезагуанозин (см. рис. 3.3).

Гипермодификации типичны также для пуринового нуклеозида в положении, примыкающем к антикодону с 3'-стороны (см. рис. 3.4). Например, остаток, фланкирующий антикодон с 3'-стороны, — это N⁶-изопентениладенозин (i⁶A) в тРНК^{Cys}, тРНК^{Ser} и тРНК^{Tyr} у эукариот; 2-метилтио-N⁶-изопентениладенозин (N⁶-изопентенил-2-метилтиоаденозин, ms²i⁶A) в аналогичных бактериальных тРНК; N⁶-(треонинокарбонил)аденозин (t⁶A) в тРНК^{Ile}, тРНК^{Thr}, тРНК^{Lys} и тРНК^{Met} у эукариот и бактерий. Нуклеозид в этом положении еще более гипермодифицирован в тРНК^{Phe} всех эукариот, где он представлен так называемым уайбутозином (yW, или Y) или его оксипроизводным (oyW).

Как уже указывалось ранее, антикодонный триплет находится приблизительно в середине цепи тРНК; на рис. 3.1 это триплет IGC в положениях 34—36. Как правило, на 5'-стороне антикодона находятся два пиримидиновых остатка, а на 3'-стороне — часто два пуриновых, хотя второй остаток на 3'-стороне может быть и пиримидиновым, как в случае тРНК^{Ala}. Вместе эти семь нуклеотидных остатков формируют так называемую антикодонную петлю (AC-петля), которая взаимодействует с мРНК и обладает характерной пространственной структурой (см. подразд. 3.2.2).

На 3'-конце всех видов тРНК расположена инвариантная тринуклеотидная последовательность CCA_{OH}; именно ее концевой аденозин акцептирует аминокислотный остаток при образовании аминоацил-тРНК. Со стороны 3'-конца молекулы тРНК на расстоянии примерно одной трети длины цепи находится консервативная область, общая для большинства видов тРНК; эта область, называемая TΨ-петлей, содержит обычно последовательность GTΨC или, значительно реже, GUΨC и фланкирована с обеих сторон пуриновыми остатками. Однако у архей она чаще всего заменена на GmΨΨC, у эукариот в молекуле инициаторной тРНК — на GAΨC или GAUC, а у митохондриальных тРНК эукариот область, соответствующая этой последовательности, может быть существенно редуцирована или даже вовсе отсутствовать. Должна быть упомянута и другая консервативная часть последовательности тРНК, расположенная в области нуклеотидных остатков 8—25; это так называемая дигидроуридиловая (dU) область. Здесь присутствует несколько инвариантных и полуинвариантных остатков: U или его т-производное (s⁴U) в положении 8, G или его метилированное производное (m²G) в положении 10, AG или AA в положениях 14—15, GG в положениях 17—21 и AG в положениях 21—24 у различных тРНК.

3.2.2. Вторичная структура

Анализ первичной структуры первой же тРНК (тРНК^{Ala} дрожжей) выявил ряд интересных черт, указавших на возможный характер сворачивания цепи во вторичную структуру. Во-первых, для 5'-концевой области цепи (положения 1—7) была характерна значительная комплементарность с областью, прилегающей к

3'-концевой части молекулы (положения 66—72), если эти области расположить антипараллельно. Во-вторых, для трех внутренних областей цепи тРНК была замечена самокомплементарность, если они завернуты на себя и сложены друг с другом антипараллельно; тем самым они могли бы формировать короткие двухспиральные структуры («шпильки»). Спаривание всех этих комплементарных последовательностей приводит к образованию структуры, схематично представленной на рис. 3.1 и известной под названием «клеверного листа». Замечательно, что вышеуказанная самокомплементарность участков цепи тРНК оказалась характерна для нуклеотидных последовательностей всех без исключения видов тРНК, изученных к настоящему времени, и соответственно все они могут быть свернуты в очень похожие структуры типа «клеверного листа».

Отдельные части структуры «клеверного листа» получили следующие названия: *акцепторный черешок* (АА-черешок) с универсальной 3'-концевой последовательностью ССА; *дигидроуридиловая шпилька* (D-шпилька) с соответствующей петлей, длина которой незначительно варьирует у разных тРНК и которая содержит, как правило, от одного до пяти дигидроуридиновых остатков; *антикодоновая шпилька* (АС-шпилька) с антикодоновой петлей, имеющей постоянную длину — 7 нуклеотидов; тимидилпсевдоуридиловая шпилька (ТЧ-шпилька), которая имеет петлю с универсальной последовательностью GTΨCGA или GTΨCAA. Кроме того, «клеверный лист» содержит *вариабельную петлю* (V-петля) между АС и ТΨ-шпильками; в тРНК^{Ala} (см. рис. 3.1) эта петля состоит лишь из пяти нуклеотидов, в то время как в других видах тРНК она может достигать длины 15—20 нуклеотидных остатков (как в случае тРНК^{Leu}, тРНК^{Ser} и бактериальной тРНК^{Tyr}). Уже отмечалось, что в тРНК митохондрий животных D-шпилька или ТΨ-шпилька могут быть в той ли иной степени редуцированы. Спаренная (двухцепочечная) часть каждой шпильки тРНК формирует двойную спираль А-формы, описанной в гл. 1. Двойная спираль является основным элементом вторичной структуры тРНК. В дополнение к каноническим уотсон-криковским парам G:C и A:U, двухспиральные области тРНК иногда содержат пары G:U, которые по своим стерическим параметрам близки к каноническим парам, а также другие неканонические пары или «противостояния», как, например, пара U:U в черешке «клеверного листа» тРНК^{Ala} (см. рис. 3.1).

Вторичная структура неспаренных областей молекулы, таких как петли и акцепторные АССА или ГССА концы, относится к другому типу. Здесь может иметь место одноцепочечная спиральная укладка нескольких остатков, поддерживаемых стэкинг-взаимодействиями между основаниями. Структура антикодоновой петли представляет особый интерес (рис. 3.5): три основания антикодона и два последующих основания, прилегающих к антикодону с 3'-стороны, накладываются друг на друга и формируют одноцепочечную правозакрученную спираль; первое основание антикодона располагается на вершине петли, и у всех трех оснований группы, способные к формированию водородных связей, остаются экспонированными наружу. Такая ориентация оснований антикодона чрезвычайно важна для взаимодействия с кодоном мРНК. Особенности первичной структуры антикодоновой петли обеспечивают поддержание описанной пространственной упаковки. Модифицированное или в некоторых случаях даже гипермодифицированное пуриновое основание прилегает непосредственно к антикодону с 3'-стороны, как и следующее основание, часто тоже пуриновое, обеспечивая стабильные стэкинг-взаимодействия в одноцепочечной спирали. В то же время два «малых» пиримидиновых основания, расположенных на 5'-стороне антикодона, и особенно при-

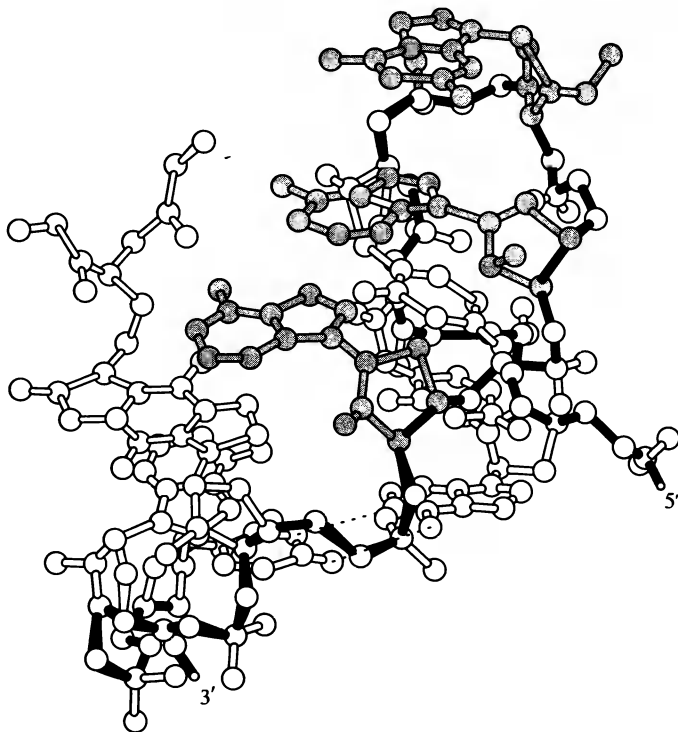


Рис. 3.5. Скелетная модель структуры антикодонной петли дрожжевой фенилаланиновой тРНК (без атомов водорода).

Связи рибозофосфатного остова показаны черным цветом, атомы и ковалентные связи трех нуклеотидов — серым.

Kim et al. (1974) *Science* **185**: 435—440. Robertus et al. (1974) *Nature* **250**: 546—551

легающий инвариантный нуклеотид U обеспечивают резкий изгиб цепи (между антикодоном и U) и поддерживают конформацию петли, в частности, за счет образования водородных связей между инвариантным U и фосфатной группой третьего остатка антикодона.

3.2.3. Третичная структура

Трехмерная структура тРНК была впервые определена для дрожжевой тРНК^{Phe}. Это было сделано независимо группами Рича и Клуга в 1974 г. с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллов тРНК^{Phe}. Огромное количество косвенных данных, равно как и прямое определение трехмерной структуры других видов тРНК, показало, что основной способ сворачивания цепи тРНК в третичную структуру универсален. Схематично это сворачивание может быть представлено следующим образом. Акцепторный черешок и ТΨ-шпилька располагаются вдоль общей оси, формируя составную двойную спираль длиной 12 нуклеотидных пар. Антикодонная шпилька и дигидроуридиловая шпилька также расположены вдоль общей оси и образуют другую двойную спираль, ее длина составляет 9 пар оснований. Эти две составные спирали ориентированы по направлению к друг другу приблизительно под прямым углом так, что дигидроуридиловая петля под-

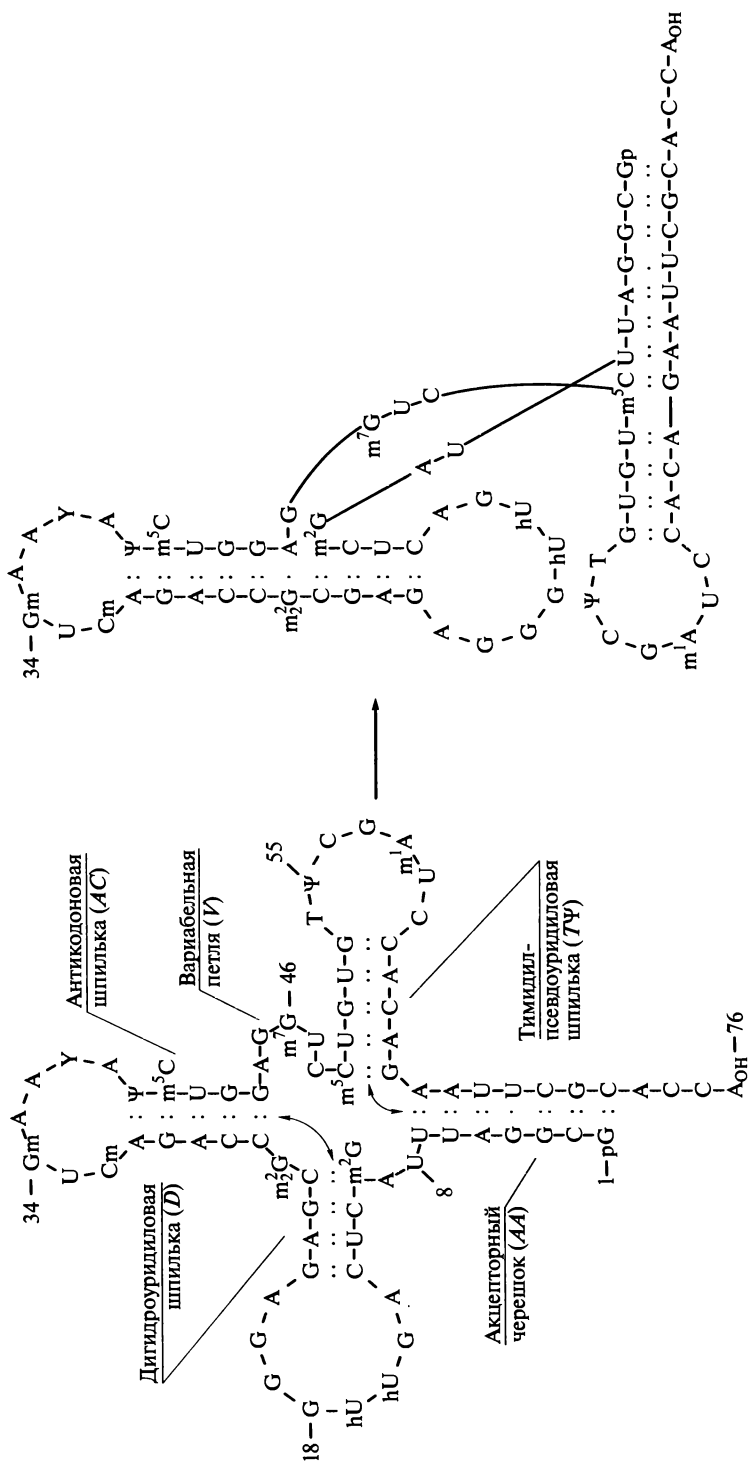


Рис. 3.6. Схема укладки двуспиральных участков (трех шпилек и черешка) тРНК при формировании третичной структуры (на примере фенилаланиновой тРНК дрожжей).

Kim et al. (1973) *Science* 179: 285—288; 185: 435—440

ходит близко к ТΨ-петле и связывается с ней за счет взаимодействия между инвариантом GG и инвариантом ΨС (рис. 3.6). Структура выглядит подобно букве L с вершинами двух ветвей, соответствующими антикодону и акцепторному 3'-концу. В области внутреннего угла молекулы, имеющей L-образную форму, на дигидроуридиловую спираль накладываются короткий однотяжевой мостик между акцепторным черешком и дигидроуридиловой спиралью (остатки 8 и 9), часть дигидроуридиловой петли и добавочная вариабельная петля, что приводит к образованию ядра молекулы с рядом третичных взаимодействий. На схематично изображенной модели дрожжевой тРНК^{Phe} можно видеть, что в ядре в области угла, особенно на его внутренней стороне, имеют место концентрация и компактное взаимозакручивание нескольких участков цепей (рис. 3.7).

Каждая ветвь L-образной молекулы тРНК имеет длину около 70 Å, «толщина» молекулы приблизительно 20 Å, расстояние между антикодоном и акцепторным концом составляет 76—78 Å. Все три основания антикодона на вершине одной ветви повернуты к внутренней стороне угла L-образной молекулы.

На рис. 3.7 видно, что между основаниями цепи в молекуле тРНК имеется большое количество неканонических взаимодействий. Во-первых, угол L-образ-

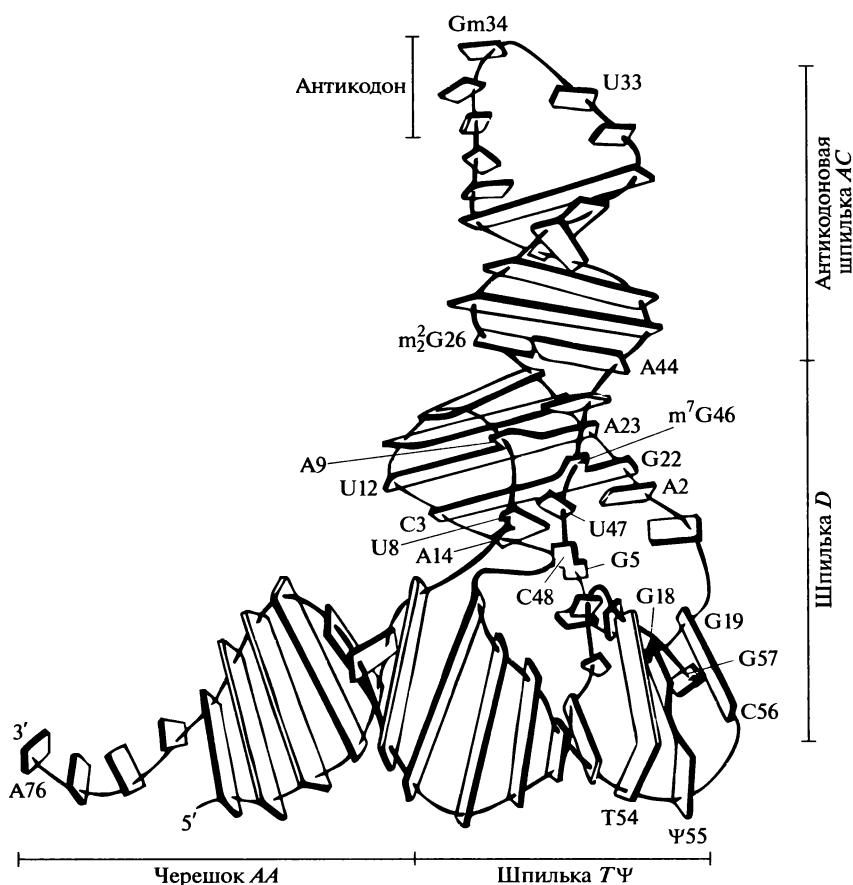


Рис. 3.7. Схема третичной структуры фенилаланиновой тРНК дрожжей Kim (1975) *Nature* 256: 679—681. Rich and Kim (1978) *Scientific American* 238: 52—62

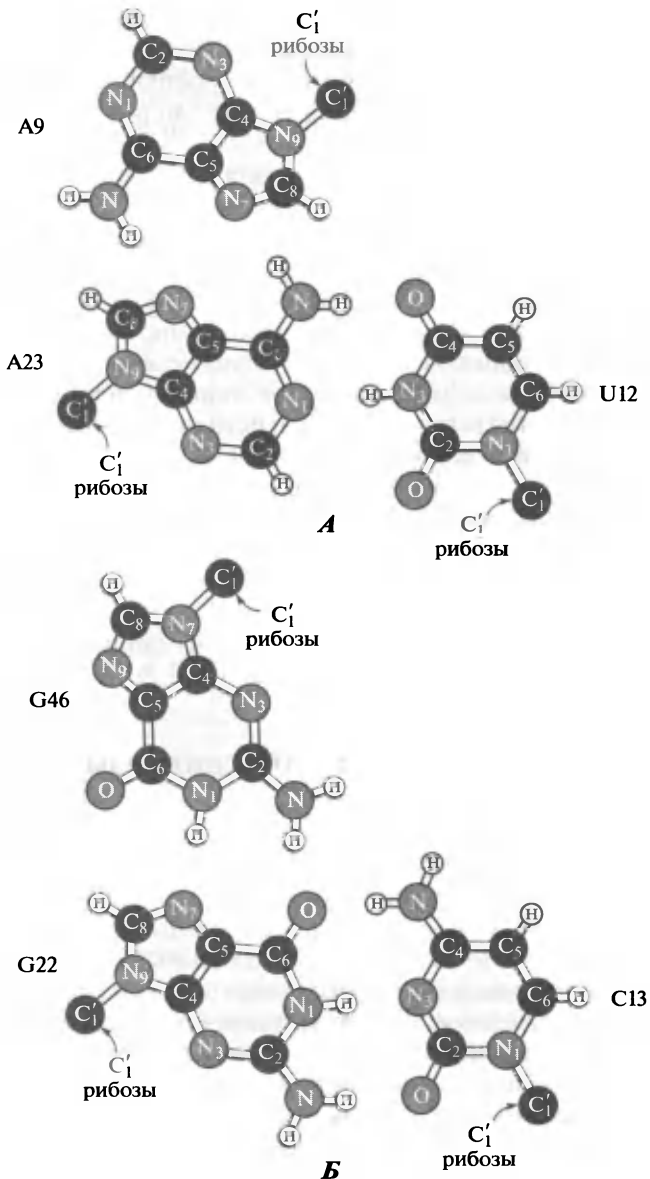


Рис. 3.8. Тройственные взаимодействия оснований в ядре молекулы тРНК.

А: пара U12:A23 с внедренным в глубокий желобок A9 (хугстиновское взаимодействие A9:A23).

Б: пара C13:G22 с внедренным в глубокий желобок m⁷G46 (хугстиновское взаимодействие G22:m⁷G46).

См. рис. 3.7

ной молекулы стабилизирован стэкинг-взаимодействиями и водородными связями между дигидроуридиловой петлей и ТΨ-петлей. Взаимодействие между инвариантами G19 и C56 относится к уотсон-кривковскому типу, в то время как взаимодействие между инвариантами G18 и Ψ55 — необычный тип спаривания, в котором участвуют водородные связи атома О при С4 пиримидинового кольца с N1 и N при С2 пуринового кольца G. Кроме этого имеет место необычно силь-

ное стэкинг-взаимодействие между тремя остатками гуанозина в том же угле: G57 оказывается вставлен (интеркалирован) между G18 и G19. Более того, G57 через атом N при C2 пуринового кольца формирует водородную связь с остатками рибозы G18 и G19, в то время как через свой атом N7 он образует водородную связь с рибозой Ψ55.

Еще более сложная структура характерна для ядра молекулы. Как уже упоминалось, здесь соприкасаются различные части полинуклеотидной цепи. Характерной особенностью является пурин-пуриновое G:A или A:G (в зависимости от вида тРНК) спаривание между остатками 26 и 44. Характер G:C или A:U спаривания (в разных видах тРНК) между остатками 15 и 48 необычен для двойных спиралей: в этом случае ориентация цепей параллельна. Еще более необычно A:U спаривание между остатками 14 и 8, где N7 пуринового кольца участвует в образовании водородной связи (хугстиновское взаимодействие). Эту часть молекулы характеризуют тройственные взаимодействия с участием водородных связей, такие как U:A:A или эквивалентные им G:C:G и U:A:G в других тРНК, между остатками 12, 23 и 9 соответственно (рис. 3.8, А). Тройственные взаимодействия с помощью водородных связей показаны также для C:G:G или эквивалента U:A:A в других тРНК между остатками 13, 22 и 46 соответственно (см. рис. 3.8, Б).

Компьютерные изображения атомной модели молекулы дрожжевой тРНК^{Phe} и ее скелетной модели (вид со стороны ТΨ-петли) приведены на рис. 3.1 в цв. вкл. (ср. со схематическим представлением на рис. 3.7).

3.3. Аминоацил-тРНК-синтетазы

Несмотря на универсальность основных черт трехмерной структуры молекул тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы обнаруживают значительные структурные различия в зависимости от их аминокислотной специфичности. Как правило, аминоацил-тРНК-синтетазы представляют собой относительно большие белки с молекулярной массой около 100 кДа, хотя некоторые из них могут иметь как меньшую молекулярную массу (например, около 50 кДа в случаях бактериальных цистеиниловой и глутаминовой синтетаз), так и бóльшую (более 200 кДа в случаях глициловой, аланиловой и фенилаланиловой синтетаз). Одна треть аминоацил-тРНК-синтетаз являются мономерами, половина — гомодимеры (типа α_2), а три упомянутых выше больших аминоацил-тРНК-синтетазы — тетрамеры (типа α_4 или $\alpha_2\beta_2$) (табл. 3.1). Молекулярные массы субъединиц димерных и тетрамерных ферментов варьируют от 35 до 90 кДа. В случае больших мономерных ферментов, таких как валиновая, лейциновая и изолейциновая аминоацил-тРНК-синтетазы бактерий и дрожжей, имеющих молекулярные массы от 100 до 120 кДа, их полипептидные цепи состоят из двух гомологичных областей, формирующих два сходных домена, каждый с молекулярной массой около 50—60 кДа. В то же время аргининовая, цистеиниловая и глутаминовая синтетазы, а также глутамино-ниловая синтетаза бактерий состоят из единственной полипептидной цепи (также α_1 типа) с молекулярной массой около 50—60 кДа, которая не подразделяется на две гомологичных области.

Исходя из анализа субъединичной и доменной структуры аминоацил-тРНК-синтетаз, можно представить некий общий тип их принципиальной организации. Действительно, большинство синтетаз имеют молекулярную массу около 100 кДа

Классификация бактериальных (*E. coli*) аминоацил-тРНК-синтетаз (J. Cavarelli and D. Moras, in «tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function» (D. Söell and U. RajBhandary, eds.), p. 412, ASM Press, Washington DC, 1995)

Подкласс	Класс I (АТФ-связывающий участок — «россмановская укладка»)			Класс II (АТФ-связывающий участок — антипараллельный β-слой)		
	Аминокислота	Четвертичная структура	Место аминоацилирования	Аминокислота	Четвертичная структура	Место аминоацилирования
a	Leu Ile Val Cys Met	α α α α α ₂	2'ОН 2'ОН 2'ОН 2'ОН или 3'ОН 2'ОН	His Pro Ser The	α ₂ α ₂ α ₂ α ₂	3'ОН 3'ОН 3'ОН 3'ОН
b	Glu Gln Arg	α α α	2'ОН 2'ОН 2'ОН	Asp Asn Lys	α ₂ α ₂ α ₂	3'ОН 3'ОН 3'ОН
c	Tyr Trp	α ₂ α ₂	2'ОН или 3'ОН 2'ОН	Gly Ala Phe	α ₂ β ₂ α ₄ α ₂ β ₂	3'ОН 3'ОН 2'ОН

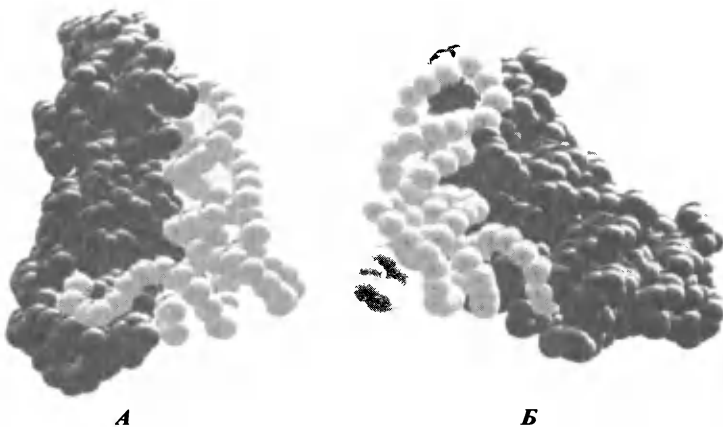
и состоят либо из двух субъединиц, либо из двух сходных половинок (супердоменов) в пределах одной полипептидной цепи. Следовательно, принципиальный структурный блок — субъединица или супердомен синтетазы — имеет молекулярную массу около 50 (от 40 до 60) кДа, и многие аминоацил-тРНК-синтетазы могут рассматриваться как димеры или псевдодимеры, построенные из таких блоков ($\approx 50 \times 2$). Синтетазы с большей молекулярной массой (около 200 кДа) могут быть «дублированными» ферментами этого типа. В действительности, однако, субъединица фермента в некоторых случаях может быть значительно больше; например, бактериальная аланиновая аминоацил-тРНК-синтетаза состоит из четырех идентичных субъединиц с молекулярной массой около 100 кДа дальтон каждая, и нет никаких указаний на наличие повторяющихся последовательностей внутри субъединицы. С другой стороны, в таких относительно небольших односубъединичных ферментах, как цистеиновая и аргининовая аминоацил-тРНК-синтетазы (молекулярные массы 52 и 64,5 кДа соответственно), никаких двух гомологичных супердоменов не обнаруживается.

Как бы то ни было, согласно функциональным тестам молекулы многих (но не всех) аминоацил-тРНК-синтетаз обладают двумя наборами субстратсвязывающих участков; другими словами, они являются димерами в функциональном

смысле). Однако активные центры двух субъединиц или двух супердоменов фермента не полностью независимы и могут значительно влиять друг на друга как в димерном, так и в двухдоменном ферментах, демонстрируя таким образом определенную кооперативность (см. ниже).

Несмотря на очевидное структурное разнообразие молекул аминоксил-тРНК-синтетаз, оказалось, что они обладают структурными мотивами, основываясь на которых можно выявить гомологию между некоторыми из них и провести распределение гомологичных видов по классам и подклассам. В настоящее время все 20 аминоксил-тРНК-синтетаз, различающихся по специфичности в отношении аминокислот, разделяют на два класса, каждый из которых включает десять ферментов (см. табл. 3.1; Морас и др., 1990). Класс I включает аминоксил-тРНК-синтетазы, специфичные для аргинина, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, изолейцина, лейцина, метионина, триптофана, тирозина и валина. Ферменты этого класса являются преимущественно мономерными, за исключением метиониновой, триптофановой и тирозиновой аминоксил-тРНК-синтетаз, которые представляют собой гомодимеры. Мономерная глобула подразделяется на домены. N-концевой домен молекулы ответственен за связывание всех трех субстратов, а именно АТФ, аминокислоты и акцепторного черешка тРНК, а также за катализ реакций, протекающих между ними. Этот домен характеризуется присутствием динуклеотидсвязывающей структуры — так называемой укладки Россмана (ранее обнаруженной в дегидрогеназах, киназах и многих других белках, использующих АТФ или другие макроэргические нуклеотиды), а также двух консервативных последовательностей (His-Ile-Gly-His и Lys-Met-Ser-Lys-Ser), расположенных в каталитическом центре или поблизости от него. Классическая укладка Россмана формируется повторяющимися $\beta\alpha\beta$ -мотивами, так что шеститяжевой параллельный β -слой оказывается зажатым между двумя парами α -спиралей (в качестве примеров такой укладки см. домен I на рис. 9.4 и G-домен на рис. 11.2). С-концевая половина фермента участвует в специфическом узнавании молекулы тРНК, взаимодействуя с антикодоновой петлей и черешком. Фермент этого класса подходит к молекуле тРНК со стороны ее D-петли и с внутренней стороны угла молекулы, контактируя с малым (мелким) желобком акцепторной спирали (рис. 3.9, А).

Класс II включает аминоксил тРНК-синтетазы, специфичные для аланина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глицина, гистидина, лизина, фенилаланина, пролина, серина и треонина. Каждый фермент этого класса состоит из двух или четырех субъединиц (см. табл. 3.1). Тип сворачивания их полипептидных цепей существенно отличается от того, который характерен для ферментов класса I. Прежде всего, их АТФ-связывающий каталитический домен построен из семитяжевого антипараллельного β -слоя (в качестве примера см. подобные укладки в домене II на рис. 9.4 и домене II на рис. 11.2), в отличие от россмановской укладки аминоксил-тРНК-синтетаз класса I с параллельным β -слоем между двумя слоями спиралей. Каталитический домен содержит также относительно консервативные, характерные для этого класса мотивы последовательности, которые не имеют ничего общего с мотивами в ферментах класса I. В случае аспарагиновой, аспарагиниловой, лизиловой и сериловой синтетаз этот большой домен, который участвует как в связывании субстратов (АТФ, аминокислоты и акцепторного конца тРНК), так и в катализе, составляет С-концевую часть фермента, в то время как N-концевая часть участвует во взаимодействии с дистальной областью молекулы тРНК, такой, например, как антикодон. У других аминоксил-тРНК-синте-



A

B

Рис. 3.9. Масштабные модели комплексов тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазами двух классов.

A: класс I (комплекс $\text{GlnRS}\cdot\text{tRNA}^{\text{Gln}}$, тРНК контактирует с ферментом со стороны своей D-петли).
B: класс II (комплекс $\text{AspRS}\cdot\text{tRNA}^{\text{Asp}}$, тРНК контактирует с ферментом со стороны своей TΨ-петли)

таз класса II — треониловой, пролиловой, гистидиловой, глициловой и аланиловой — субстратсвязывающий каталитический домен занимает N-концевую часть молекулы. Как уже указывалось, ферменты этого класса состоят из субъединиц, и каждая субъединица связывает одну молекулу тРНК. Фермент подходит к молекуле тРНК со стороны вариательной и TΨ-петель и контактирует с большим (глубоким) желобком спирали акцепторного черешка (см. рис. 3.9, **B**), в отличие от взаимодействия тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазами класса I.

Необходимо отметить несколько характерных особенностей эукариотических аминоксил-тРНК-синтетаз, прежде всего у животных. Как и многие другие белки, играющие важную роль в белоксинтезирующем аппарате эукариотической клетки (см. например, подразд. 9.2.2), у некоторых эукариот, в частности у млекопитающих, синтетазы организованы в большие мультиферментные комплексы (Данг и др., 1982; Валлер и др., 1983). Например, из клеток млекопитающих может быть выделен комплекс с молекулярной массой около 10^6 Да, а обладающий аминоксил-тРНК-синтетазной активностью по отношению к девяти аминокислотам и соответствующим тРНК, а именно аргиниловой, аспарагиловой, глутаминовой, глутаминиловой, изолейциловой, лейциловой, лизиловой, метиониловой и пролиловой. При этом активность по отношению к глутаминовой и пролиловой тРНК и соответствующим аминокислотам обеспечивается одним и тем же ферментом комплекса. Существование этих ферментов в комплексе не является, однако, необходимым для их собственной активности: с одной стороны, они могут присутствовать в клетках также в индивидуальном виде, а не в виде агрегата; с другой стороны, они, по-видимому, и в комплексе функционируют независимо друг от друга. В клетках млекопитающих обнаружены также комплексы меньшего размера, включающие валиновую аминоксил-тРНК-синтетазу и факторы элонгации eEF1A и eEF1B (так называемая «тяжелая форма» фактора элонгации 1, или eEF1_н; см. подразд. 9.2.1).

Аминоксил-тРНК-синтетазы эукариот могут непосредственно взаимодействовать с полирибосомами. Хотя связывание достаточно слабое и обратимое, в каждый данный момент времени значительная часть клеточных аминоксил-

тРНК-синтетаз оказывается лабильно связанной с функциональными рибосомами в составе полирибосом. Эти характерные черты эукариотических систем обусловлены, по-видимому, структурными особенностями эукариотических синтетаз. Было установлено, что, в отличие от аминоацил-тРНК-синтетаз прокариот, их аналоги у эукариот обладают сродством к РНК с высокой молекулярной массой, включая мРНК и рибосомную РНК (Альжанова, Спиринов и др., 1980). Эта особенность эукариотических аминоацил-тРНК-синтетаз согласуется с данными, согласно которым эукариотические аминоацил-тРНК-синтетазы имеют субъединицы несколько большего размера, чем аминоацил-тРНК-синтетазы прокариот, в частности за счет присутствия на N-конце дополнительного участка, который содержит значительное количество основных аминокислот. Неспецифическое сродство к РНК (РНК-связывающая способность) аминоацил-тРНК-синтетаз эукариот может быть ответственна за их концентрирование и частичную компартиментализацию вблизи белоксинтезирующих частиц на полирибосомах.

3.4. Аминоацилирование тРНК

Связывание аминокислоты с 3'-концом тРНК, катализируемое аминоацил-тРНК-синтетазой, сопряжено с гидролизом АТФ. Суммарная реакция процесса может быть представлена следующим образом:



где Aa — аминокислота; Aa-tRNA — аминоацил-тРНК; PP_i — неорганический пиррофосфат.

Показано, что фермент катализирует две различные реакции, являющиеся двумя последовательными стадиями вышеуказанного процесса.

Первой стадией реакции, катализируемой аминоацил-тРНК-синтетазой, является *активация* аминокислоты. На этой стадии карбоксильная группа аминокислоты атакует связь между α- и β-фосфатными группами АТФ, в результате чего образуется смешанный ангидрид аминоациладенилат и неорганический пиррофосфат (рис. 3.10):



Данная реакция обратима, и если к реакционной смеси добавить [³²P]пиррофосфат, то метка вскоре обнаруживается в виде [³²P]АТФ. Аминоациладенилат, образующийся в реакции активации аминокислоты, остается связанным с ферментом и не освобождается в раствор. Следует отметить, что эта реакция, а следовательно, и вся суммарная реакция в целом сдвигаются в сторону образования аминоациладенилата и соответственно аминоацил-тРНК благодаря гидролизу неорганического пиррофосфата, катализируемому пиррофосфатазой. Таким образом, продукция пиррофосфата на стадии активации аминокислоты и последующий гидролиз пиррофосфата до ортофосфата играют важнейшую роль в энергетическом обеспечении нужного направления всего процесса.

Реакция, катализируемая на второй стадии той же самой аминоацил-тРНК-синтетазой, осуществляет *акцентирование* аминокислоты молекулой тРНК: 2'- или 3'-гидроксил остатка рибозы 3'-концевого аденозина тРНК атакует ангидридную группу аминоациладенилата, что приводит к образованию сложноэфир-

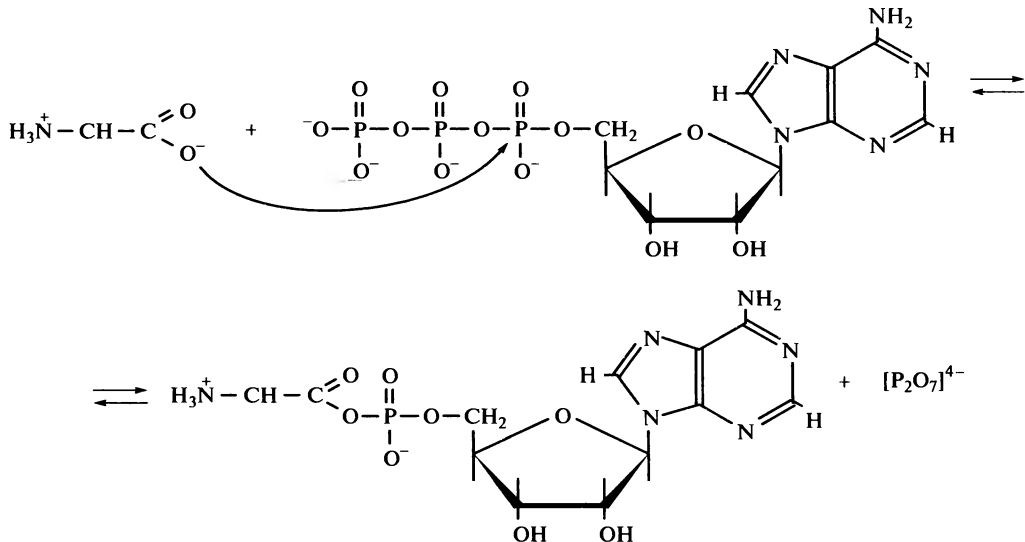
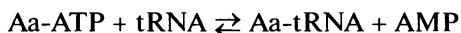


Рис. 3.10. Реакция активации аминокислоты, катализируемая аминоксил-тРНК-синтетазами: атом кислорода карбоксильной группы свободной аминокислоты атакует атом фосфора α -фосфатной группы АТФ с образованием смешанного ангидрида — аминоксиладенилата

ной связи между аминоксилным остатком и тРНК с освобождением АМФ (рис. 3.11):



Интересно, что различные аминоксил-тРНК-синтетазы обладают различной специфичностью по отношению к положению гидроксила рибозы, участвующего в реакции трансацилирования (см. табл. 3.1). Все аминоксил-тРНК-синтетазы класса I катализируют присоединение аминокислот к 2'-положению рибозы 3'-концевого остатка аденозина. Тирозиновая и цистеиновая синтетазы могут, однако, катализировать реакцию как с 2'-, так и с 3'-гидроксильными группами рибозы аденозина. Аминоксил-тРНК-синтетазы класса II катализируют реакцию 3'-гидроксильной группы с аминокислотным остатком; единственным исключением среди них является фенилаланиновая синтетаза, которая соединяет аминокислоту с 2'-гидроксилом концевого аденозина тРНК. Это не столь важно для последующей судьбы образовавшейся аминоксил-тРНК, поскольку в водном растворе аминоксилный остаток спонтанно мигрирует между 2'- и 3'-положениями (через образование нестабильного циклического 2',3'-производного), и в итоге эти две формы находятся в равновесии.

Таким образом, аминоксил-тРНК-синтетазы используют три субстрата различной химической природы: АТФ, аминокислоту и тРНК. Соответственно они должны обладать тремя различными субстратсвязывающими участками. АТФ является универсальным субстратом для всех аминоксил-тРНК-синтетаз, в то время как по отношению к аминокислоте и тРНК каждая аминоксил-тРНК-синтетаза проявляет высокую специфичность.

Как уже отмечалось, во многих случаях аминоксил-тРНК-синтетазы представляют собой димеры или псевдодимеры и соответственно обладают двумя наборами субстратсвязывающих участков. В пределах каждой субъединицы (или эквивалентного домена) субстратсвязывающие участки взаимозависимы, и, кроме

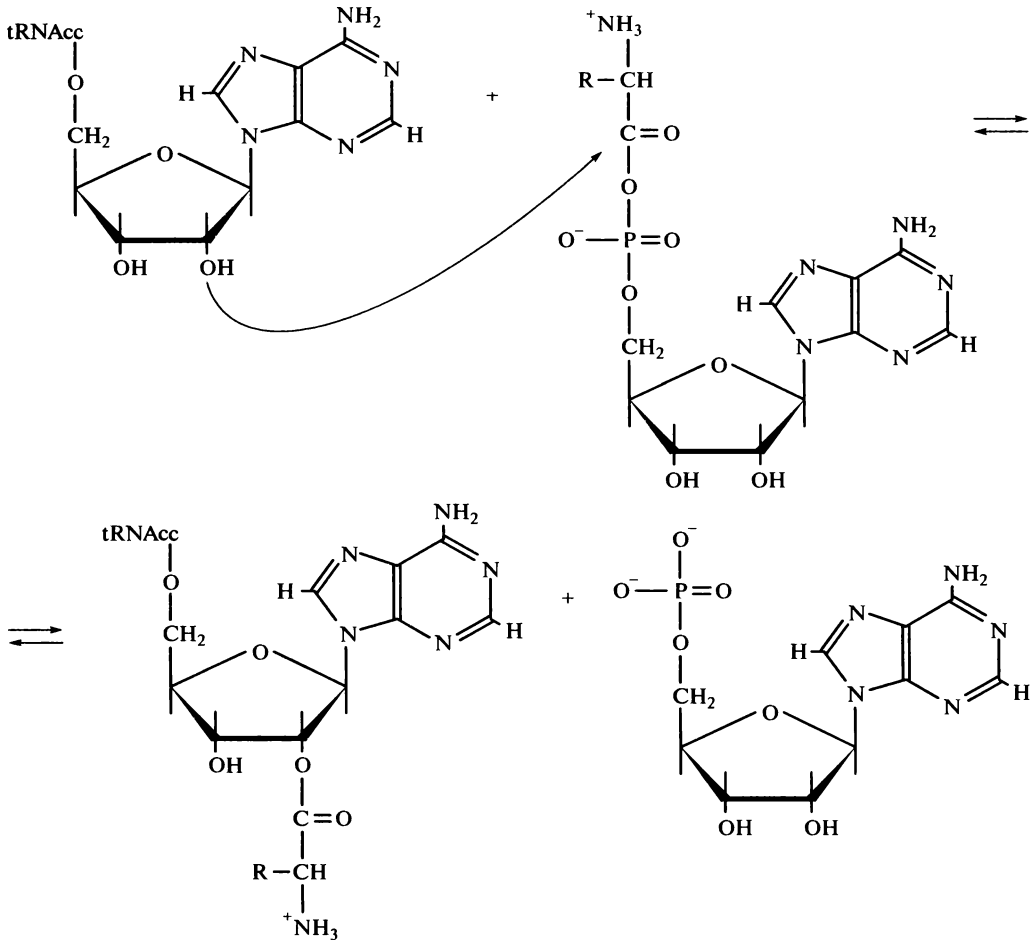


Рис. 3.11. Реакция переноса (акцептирования) аминокислотного остатка от аминокциладенилата на молекулу тРНК, катализируемая аминокцил-тРНК-синтетазой: атом кислорода гликольной группы рибозы концевго аденозина тРНК атакует атом карбонильного углерода ангидридной группы аминокциладенилата с образованием аминокцил-тРНК

того, имеется выраженная взаимозависимость между субстратсвязывающими участками различных субъединиц (или доменов). Часто наблюдается синергизм: связывание молекулы одного субстрата облегчает связывание другого. С другой стороны, в связывании двух молекул тРНК наблюдается отрицательная кооперативность: связывание одной молекулы тРНК делает связывание другой молекулы (на другой субъединице или домене) менее прочным.

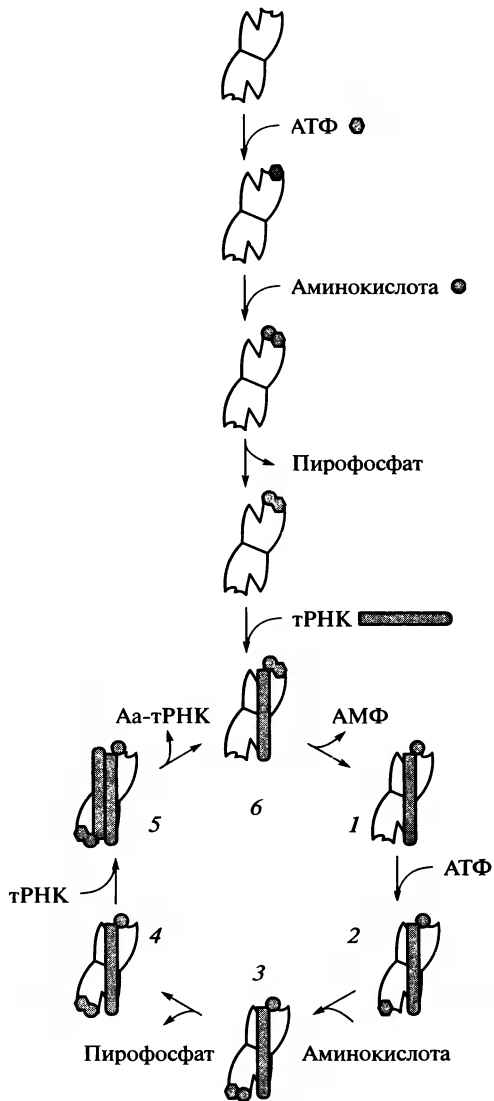
Пример последовательности, в которой субстраты добавляются к димерному ферменту, схематично представлен на рис. 3.12. Если начинать с фермента, свободного от субстратов (верхняя часть схемы), то на первых стадиях происходит связывание молекул малых субстратов, таких как АТФ и аминокислота, и связывание одного из них стимулирует связывание другого (синергизм). Эти субстраты, связанные с ферментом, взаимодействуют, формируя аминокциладенилат, и образующийся пиррофосфат освобождается в раствор. Связывание малых субстратов и образование аминокциладенилата стимулирует связывание тРНК,

Рис. 3.12. Схема последовательности событий при функционировании димерных или дву-доменных аминокил-тРНК-синтетаз в терминах модели «реактивности половины участков» (*half-of-the-sites-reactivity model*).

Пояснения см. в тексте

что приводит к аминокилированию тРНК ферментом и освобождению АМФ в раствор. Аминокил-тРНК, когда она присутствует в виде единственной копии на димерную молекулу, может диссоциировать от фермента, но достаточно медленно, а связывание второй молекулы тРНК стимулирует диссоциацию. Получается цикл, представленный в нижней части рис. 3.12, где один тРНК-связывающий участок постоянно заполнен, и фермент демонстрирует активность лишь половины своих субстратсвязывающих участков («*half-of-the-sites-reactivity*»).

В условиях, когда фермент работает с избытком субстрата, реакция осуществляется по пути, представленному в нижней части рис. 3.12. Этот путь, как правило, и реализуется в нормальных условиях. Состояние 1 достигается, когда активный центр одной субъединицы (или домена) заполнен аминокил-тРНК, в то время как другой — свободен. Таким образом, только субстратсвязывающие участки другого активного центра фермента способны связывать субстраты. Последовательное или независимое связывание малых субстратов, АТФ и аминокислоты (состояния 2 и 3) приводит к образованию связанного с ферментом аминокиладенилата (состояние 4), который в свою очередь стимулирует связывание тРНК со вторым активным центром фермента (состояние 5). Из-за отрицательной кооперативности, упомянутой выше, связывание тРНК со вторым активным центром ослабляет взаимодействие аминокил-тРНК с ферментом в первом связывающем центре, в результате чего аминокил-тРНК освобождается в раствор, оставляя фермент с одним заполненным активным центром и вакантным вторым (состояние 6). Таким образом, два активных центра димерного (или двухдоменного) фермента работают альтернативно. Конечный продукт, аминокил-тРНК, не освобождается в раствор немедленно после синтеза, хотя он завершен, а «ждет» до тех пор, пока второй субстрат, тРНК, не войдет в соответствующий связывающий центр. Нужно вновь отметить, что описанная выше модель является примером возможного реакци-



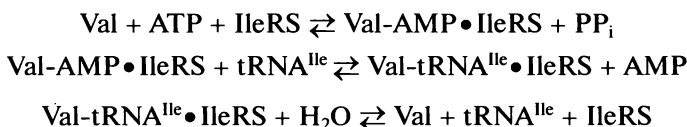
онного пути в случае ряда аминоксил-тРНК-синтетаз, но не может рассматриваться как общая для всех.

3.5. Специфичность аминокислотирования тРНК

3.5.1. Специфичность по отношению к аминокислоте

Для обеспечения точного декодирования мРНК во время трансляции аминоксил-тРНК-синтетаза должны обладать очень высокой специфичностью при выборе аминокислот и тРНК в качестве субстратов. В случае выбора аминокислоты фермент должен дискриминировать между субстратами, которые иногда обладают очень похожими структурами, такими, например, как изолейцин и валин. При этом вероятность ошибки в аминокислотировании тРНК оказывается необычайно мала и даже для родственных аминокислот (например, изолейцина и валина) не превышает 10^{-4} в нормальных физиологических условиях.

Однако анализ стадий связывания аминокислот и последующего обратимого формирования аминоксиладенилата с использованием АТФ-пирофосфатного обмена показал, что фермент не может на этих стадиях обеспечить такую высокую специфичность в дискриминации родственных аминокислот. Например, изолейциновая аминоксил-тРНК-синтетаза может эффективно связывать валин и образовывать валиладенилат. Подобным же образом валиновая аминоксил-тРНК-синтетаза может связывать и активировать изолейцин, так же как и ряд других аминокислот, таких как аланин, серин, цистеин и треонин. Фенилаланиновый фермент активирует метионин, лейцин и тирозин. Тем не менее ни одна из перечисленных выше «ложно» активированных аминокислот не акцептируется тРНК. Таким образом, помимо механизма дискриминации в связывающем участке ряд аминоксил-тРНК-синтетаз может обладать специальным механизмом, корректирующим ошибки, который включается после того, как образуется аминоксиладенилат. Механизм коррекции состоит в том, что связывание своей («свойственной» ферменту) тРНК приводит к гидролитическому отщеплению активированной аминокислоты, если аминокислотный остаток был «не свой» («не свойственен» ферменту). По крайней мере некоторые аминоксил-тРНК-синтетазы используют механизм, в котором «ложно» активированная («не своя») аминокислота, связанная с ферментом в виде аминоксиладенилата, переносится на тРНК, но эфирная связь между этой чужой аминокислотой и тРНК немедленно гидролизуется ферментом:



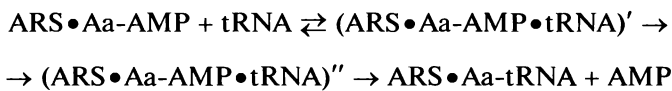
Это означает, что у фермента есть второй шанс дискриминировать между аминокислотными остатками, теперь уже в форме их сложноэфирных производных, и если остаток «не свой» («не свойственен» ферменту), то активируется молекула воды, которая атакует сложноэфирную связь. Показано, что в гидролизе валил-тРНК^{Ile} изолейцил-тРНК-синтетазой важную роль играет свободный гидроксил 3'-концевой рибозы тРНК.

Некоторые другие аминоксил-тРНК-синтетазы могут использоваться иной механизмом коррекции («редактирования»), когда «не свойственный» ферменту аминоксиладенилат гидролизуется ферментом до переноса аминокислотного остатка на тРНК.

3.5.2. Специфичность по отношению к тРНК

Уже было сказано, что связывание тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазой — многостадийный процесс. Сначала тРНК связывается не очень специфично, и на этой стадии фермент может взаимодействовать с рядом не свойственных ему тРНК. Изолейцил-тРНК-синтетаза, например, может связывать тРНК^{Val}, и это связывание лишь в пять раз слабее, чем связывание свойственной для фермента тРНК^{Ile}. Фермент также взаимодействует с тРНК^{Glu}, но это связывание уже в 10 000 раз слабее, чем связывание со своей тРНК^{Ile}. В целом, для различных комбинаций аминоксил-тРНК-синтез с «не свойственными» им видами тРНК обнаружено очень различающееся сродство: от почти полного его отсутствия до сродства, близкого к тому, что характерно для «свойственной» ферменту тРНК. Сродство ферментов к тРНК обычно увеличивается с уменьшением рН и ионной силы, а также под действием органических растворителей; это указывает на то, что в связывание значительный вклад вносят ионные взаимодействия. Соответственно те же самые факторы стимулируют неспецифическое связывание тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазами. Однако ионы магния часто оказывают противоположное действие: они могут уменьшить связывание с аминоксил-тРНК-синтетазами «не свойственных» им видов тРНК, что фактически приводит к увеличению специфичности связывания. Последний эффект рассматривается обычно как результат действия ионов магния на конформацию как фермента, так и тРНК.

Начальное связывание тРНК с ферментом представляет собой быструю стадию — скорости прямой и обратной реакций (ассоциации и диссоциации) высокие. За быстрой начальной стадией может следовать медленная стадия, когда лабильный комплекс каким-то образом перестраивается. Такая перестройка комплекса происходит лишь в случае, если фермент связан со «свойственной» ему тРНК. Это — стадия *узнавания*, во время которой осуществляется главная дискриминация между «свойственными» и «не свойственными» ферменту видами тРНК. Таким образом, на первой стадии связывания происходит только грубая селекция тРНК, и основная роль данной стадии — быстрое сканирование различных видов тРНК. Если связанная тРНК «не свойственна» ферменту, она не проявит активности в индукции структурной перестройки ферментного комплекса, поэтому следующая стадия процесса не произойдет; в результате этого молекула тРНК легко диссоциирует от начального комплекса, поскольку реакция начального связывания легко обратима. Только в том случае, если связана свойственная ферменту тРНК, происходит следующая стадия — *перестройка* комплекса и создание *необходимого соответствия* между тРНК и ферментом, что обеспечивает последующее инициирование реакции аминокислирования:



Однако описанный механизм не может быть приложим ко всем аминоксил-тРНК-синтетазам. Например, показано, что тирозиновая синтетаза *E. coli*, сериновая синтетаза дрожжей, а также аргинил-тРНК-синтетазы демонстрируют очень высокую специфичность даже на стадии начального комплекса, почти не связывающая «не свойственные» виды тРНК.

Независимо от того, какой механизм реализуется, конечный результат — очень высокая точность выбора тРНК ферментом, определяемая высокой специфичностью РНК-белкового узнавания при взаимодействиях аминоксил-тРНК-синтетаз с тРНК. Установлены две основные области молекулы тРНК, которые в большинстве случаев непосредственно вовлечены в узнавание ферментом: акцепторный черешок и антикодон. Это, однако, не общее правило. Например, такие тРНК, как тРНК^{Ala} и тРНК^{Ser}, распознаются «свойственными» для них синтетазами без участия антикодонов, а главным образом за счет специфического связывания акцепторного черешка тРНК с ферментом. С другой стороны, тРНК^{Met}, по-видимому, специфически узнается своей аминоксил-тРНК-синтетазой преимущественно за счет связывания с антикодоном.

Акцепторный черешок оказывается вовлеченным в узнавание в большинстве случаев взаимодействия между тРНК и аминоксил-тРНК-синтетазами. Основание четвертого нуклеотида с 3'-конца (положение 73) часто называют «дискриминационным основанием», поскольку оно подразделяет тРНК на четыре группы по признаку узнавания: A73 присутствует в тРНК, специфичных для Ala, Arg, Ile, Leu, Lys, Pro, Tyr и Val; G73 — в тРНК, специфичных для Asp, Asp, Gln, Glu и Trp; C73 — в тРНК^{His}, U73 — в тРНК^{Cys} и тРНК^{Gly}. Дальнейшая дискриминация может определяться парами оснований на проксимальном конце молекулы. Например, присутствие пары G3:U70 в акцепторном черешке определяет узнавание тРНК аланил-тРНК-синтетазой (при условии, что присутствует A73). Для узнавания тРНК^{Gln} «свойственной» ей синтетазой черешок тРНК, помимо неспаренного дискриминатора G73, должен включать пары U1:A72, G2:C71 и G3:C70. Узнавание акцепторного черешка рассматривается как самый ранний способ узнавания в эволюции аминоксил-тРНК-синтетаз.

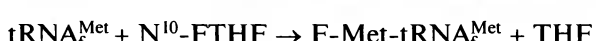
Антикодон — второй основной участок, обеспечивающий узнавание тРНК аминоксил-тРНК-синтетазами. По-видимому, у некоторых тРНК для узнавания важны все три нуклеотида антикодона (например, тРНК^{Asp}, тРНК^{Cys}, тРНК^{Gln}, тРНК^{Met}, тРНК^{Phe}, тРНК^{Trp}), в то время как у других тРНК для узнавания существенны лишь один (C35 в тРНК^{Arg}) или два остатка антикодона (C35 и C36 в тРНК^{Gly}, A35 и C36 в тРНК^{Val}).

Прочное связывание аминоксил-тРНК-синтетазы с акцепторным черешком и антикодоном может индуцировать серьезное изменение конформации в этих областях молекулы тРНК. Так, тРНК^{Gln} при взаимодействии со «свойственной» ей глутамил-тРНК-синтетазой (представителем синтетаз класса I) изменяет «классическую» конформацию 3'-концевой однотяжевой последовательности: тяж делает шпилькообразный поворот внутрь L-структуры с разрушением смежной пары оснований акцепторного черешка. Антикодоновая петля тРНК^{Gln} в комплексе с синтетазой также принимает необычную структуру: среднее основание антикодона U35 вступает в стэкинг-взаимодействие с основанием A37, прилегающим к антикодону, в то время как C34 и G36 антикодона выступают наружу, взаимодействуя с соответствующими группами белка. Вероятно, нарушения структуры описанного типа характерны для взаимодействия всех синтетаз класса I со своими тРНК.

В отличие от вышеприведенных изменений взаимодействие представителя синтетаз класса II — аспарагил-тРНК-синтетазы — с тРНК^{Asp} стабилизирует относительно тяжелую стэкинг-спиральную конформацию ГССА акцепторного конца; как и в кристаллической структуре тРНК^{Phe} (см. рис. 3.7), она продолжает спираль акцепторного черешка. Антикодоновая петля, однако, претерпевает существенное конформационное изменение, для того чтобы связаться с контактирующими группами белка: конформация U-поворота нарушается с сопутствующим нарушением стэкинг-взаимодействий всех оснований антикодона, и петля в целом перемещается к внутренней части L-структуры.

3.5.3. Специфические модификации аминоконцевых остатков после аминоконцевания

Помимо обычных видов тРНК, которые акцептируют аминокислоты и непосредственно вслед за этим переносят их к рибосомам, существуют специальные тРНК, чьи аминокислотные остатки подвергаются ферментативной модификации до участия в трансляции. Первым хорошо известным примером является формилирование аминоконцевой группы одного из двух видов метионил-тРНК (Met-tRNA_m^{Met} и Met-tRNA_f^{Met}) у бактерий, открытое Маркером и Сангером в 1964 г. В результате данной реакции образуется формилметионил-тРНК (F-Met-tRNA_f^{Met}), которая служит в качестве *инициаторной* тРНК: она первой входит в рибосому и начинает трансляцию на инициаторном кодоне AUG или GUG, так что каждая полипептидная цепь, синтезированная бактериальными рибосомами, начинается с формилметионина на N-конце. Как тРНК_m^{Met}, так и тРНК_f^{Met} аминоконцеваются одной и той же метионил-тРНК-синтетазой, но Met-тРНК_f^{Met} служит субстратом для метионил-тРНК-трансформилазы, которая переносит формильную группу от N¹⁰-формилтетрагидрофолата (N¹⁰-FTHF) на аминоконцевую группу метионинового остатка и, таким образом, обеспечивает образование N-формилметионин-тРНК_f^{Met}:



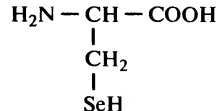
Фермент высокоспецифичен и атакует только Met-тРНК_f^{Met}.

У архебактерий, многих грамположительных бактерий, цианобактерий, хлоропластов растений, митохондрий растений и животных отсутствует глутаминил-тРНК-синтетаза. В то же время они имеют специальную тРНК, которая аминоконцевается глутамил-тРНК-синтетазой. Образовавшаяся Glu-тРНК служит субстратом для специфической аминотранспептидазы, превращающей Glu-тРНК в Gln-тРНК:



Поскольку этот вид тРНК распознает глутаминовые кодоны, он обозначается как тРНК^{Gln}, невзирая на факт, что он аминоконцевается глутамил-тРНК-синтетазой.

Двадцать первая аминокислота природных белков, селеноцистеин (Sec), также образуется на тРНК (рис. 3.13, см. обзор: Baron, C., and Böck, A., 1995). Специальная тРНК^{Sec} с антикодоном UCA аминоконцевается обычной сериновой тРНК-синтетазой. Образующаяся Ser-тРНК^{Sec} является специфическим субстратом для селеноцистеинсинтазы. Фермент связывается с Ser-тРНК^{Sec} таким об-



Селеноцистеин

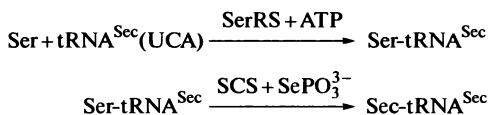
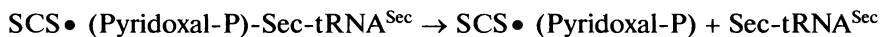
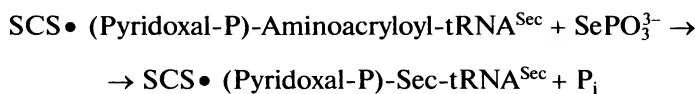
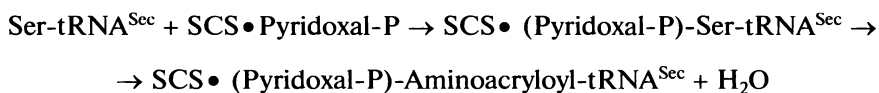


Рис. 3.13. Селеноцистеин — 21-я аминокислота природных белков, и схема пути образования остатка селеноцистеина в результате акцептирования серина специальной тРНК с последующим преобразованием серил-тРНК в селеноцистеинил-тРНК

разом, что вслед за специфическим узнаванием тРНК сериновый остаток ковалентно прикрепляется через свою аминогруппу к простетической группе активного центра фермента — пиридоксальфосфату. Затем происходит реакция дегидратации, в результате которой удаляется гидроксильная группа серина, и серильный остаток превращается таким образом в аминокрилоильный остаток. Этот интермедиат реагирует с селенофосфатом, что приводит к формированию селеноцистеинильного остатка, все еще связанного с пиридоксальфосфатом через свою аминогруппу. Последней стадией является освобождение селеноцистеинил-тРНК из этой ковалентной связи и из комплекса с ферментом. Последовательность реакций, катализируемых селеноцистеинсинтазой (СЦСаза, или SCS), представлена ниже:



ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 3

Alzhanova, A. T., Fedorov, A. N., Ovchinnikov, L. P., and Spirin, A. S. (1980). Eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases are RNA-binding proteins whereas prokaryotic ones are not. *FEBS Lett.* **120**: 225—229.

Crick, F. H. C. (1957). Discussion in *The structure of nucleic acids and their role in protein synthesis*, Biochemical Society Symposium (ed. Crook, E. M.), No. 14, pp. 25—26. Cambridge University Press, Cambridge.

Dang, C. V., Johnson, D. L., and Yang, D. C. H. (1982). High molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complexes in eukaryotes. *FEBS Lett.* **142**: 1—6.

Eriani, G., Delarue, M., Poch., O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203—206.

Hoagland, M. B., Zamecnik, P. C., and Stephenson, M. L. (1957). Intermediate reac-

- tions in protein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **24**: 215—216.
- Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merill, S.H., Penswick, J.R., and Zamir, A. (1965). Structure of a ribonucleic acid. *Science* **147**: 1462—1465.
- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H.-J., Seeman, N.C., and Rich, A. (1974). Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* **185**: 435—440.
- Marker, K., and Sanger, F. (1964). N-formyl-methionyl-s-RNA. *J. Mol. Biol.* **8**: 835—840.
- Mirande, M., Cirakoglu, B., and Waller, J.-P. (1983). Seven mammalian aminoacyl-tRNA synthetases associated within the same complex are functionally independent. *Eur. J. Biochem.* **131**: 163—170.
- Ogata, K., and Nohara, H. (1957). The possible role of the ribonucleic acid (RNA) of the pH 5 enzyme in amino acid activation. *Biochim. Biophys. Acta* **25**: 659—660.
- Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C., and Klug, A. (1974). Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* **250**: 546—551.
- Обзоры, монографии и сборники
- Киселев, Л.Л., и Вольфсон, А.Д. (1995). Аминоацил-тРНК-синтетазы высших эукариот. *Успехи биологической химии* **35**: 3—65.
- Киселев, Л.Л., Фаворова, О.О., и Лаврик, О.И. (1984). *Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК*. Изд-во «Наука», Москва.
- Baron, C., and Böck, A. (1995). The selenocysteine-inserting tRNA species: structure and function. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (Söll, D. and RajBhandary, U. L., eds.), pp. 529—544. ASM Press, Washington, DC.
- Hoagland, M. B. (1960). The relationship of nucleic acid and protein synthesis as revealed by studies in cell-free systems. In *Nucleic Acids* (eds. Chargaff, E., and Davidson, J. N.) **3**: 349—408. Academic Press, New York.
- Söll, D., and RajBhandary, U. L., eds. (1995). *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. AMS Press, Washington, DC.

РИБОСОМЫ И ТРАНСЛЯЦИЯ

4.1. Первые наблюдения

К 1940 г. А. Клоду удалось выделить из цитоплазмы клеток животных РНК-содержащие гранулы, размеры которых были меньше, чем размеры митохондрий; Клод назвал их *микросомами*. Химический анализ показал, что микросомы Клода были фосфолипидно-рибонуклеопротеидными комплексами. С другой стороны, цитохимические исследования Касперсона (1941) и Браше (1942) показали преимущественную локализацию РНК в цитоплазме и существование корреляции между количеством РНК в цитоплазме и интенсивностью синтеза белка. Позднее ряд исследователей сообщил о выделении РНК-содержащих частиц, размеры которых были значительно меньше размера микросом, из цитоплазмы растительных и животных клеток, а также из бактерий. Электронная микроскопия и седиментационный анализ в ультрацентрифуге показали, что эти частицы компактны, гомогенны по размеру, имеют более или менее сферическую форму, обладая диаметром около 200 Å (20 нм), и характеризуются резкими седиментационными границами, соответствующими коэффициентам седиментации от 30 до 100 ед. Сведберга. Первое однозначное свидетельство, что такие частицы, выделенные из бактерий, являются рибонуклеопротеидами, было получено Шахманом, Парди и Стэниером в 1952 г.

Совершенствование техники микротомии и электронной микроскопии ультратонких срезов клеток животных привело к выявлению одинаковых по размеру плотных гранул с диаметром около 20 нм непосредственно в клетке. Электронно-микроскопические исследования, проведенные Паладе (1955), показали, что такие плотные гранулы в большом количестве присутствуют в цитоплазме клеток животных. Эти гранулы были видны либо прикрепленными к мембране эндоплазматического ретикулума, либо свободно распределенными в цитоплазме. Микросомы Клода были идентифицированы как фрагменты эндоплазматического ретикулума с присоединенными к ним гранулами. Стало ясно, что гранулы Паладе являются рибонуклеопротеидными частицами и что они содержат большую часть цитоплазматической РНК, вовлеченной в синтез белка (Паладе и Сикевич, 1956).

В период между 1956 и 1958 гг. очищенные препараты рибонуклеопротеидных частиц были выделены и исследованы в нескольких лабораториях. Среди этих исследований — выделение рибонуклеопротеидных частиц из дрожжей (Чоу и Шахман, 1956), из высших растений (Тсо, Боннер и Виноград, 1956) и животных (Петерман и Гамильтон, 1957), а также бактерий *Escherichia coli* (Тиссьер и Уотсон, 1958). В 1958 г. на первом симпозиуме, посвященном этим частицам и их роли в биосинтезе белка, было предложено называть их *рибосомами* (Робертс, 1958).

Изучение функциональной роли рибосом происходило параллельно с описанием их структуры. Эксперименты Замечника и сотрудников (Литтлфилд, Келлер и др.) впервые убедительно продемонстрировали, что рибонуклеопротеидные ча-

стицы микросом ответственные за включение радиоактивных аминокислот во вновь синтезированные белки (1955). Последующие эксперименты, проведенные в той же лаборатории, показали, что свободные рибосомы, не прикрепленные к мембранам эндоплазматического ретикулума, также обеспечивают включение аминокислот в синтезируемые белки. Функции бактериальных рибосом интенсивно исследовала группа Робертса (1959), которая окончательно установила, что белки синтезируются на рибосомах и затем распределяются по всей бактериальной клетке.

4.2. Локализация рибосом в клетке

Рибосомы в больших количествах присутствуют в тех клетках, где идет интенсивный синтез белка. В клетках бактерий они дисперсно распределены в цитоплазме и составляют около 30 % (а иногда и до 50 %) их массы. На электронных микрофотографиях видно, что все пространство внутри клетки, за исключением области нуклеоида (ДНК), буквально набито рибосомами (рис. 4.1). В клетке такой высококоразвитой бактерии, как *Escherichia coli*, — от 10 000 до 60 000 рибосом, в зависимости от условий роста.

Относительное содержание (концентрация) рибосом в клетках эукариот меньше; здесь количество рибосом может очень значительно варьировать в зависимости от белоксинтезирующей активности соответствующей ткани или индивидуальной клетки. Основная часть рибосом обнаруживается в цитоплазме. В клетках с активной секрецией белка и развитой сетью эндоплазматического ретикулума значительная часть цитоплазматических рибосом прикреплена к мембране ретикулума и локализуется на его поверхности, обращенной в цитоплазматический матрикс (рис. 4.2). Эти рибосомы синтезируют белки, которые транспортируются в люминальное пространство ретикулума для последующей секреции (см. гл. 17). Синтез белков для внутренних потребностей клетки происходит на свободных цитоплазматических рибосомах, которые не ассоциированы с мембраной, а рассеяны в цитоплазматическом матриксе. Именно поэтому цитоплазма эмбриональных, недифференцированных, быстро растущих или размножающихся клеток содержит преимущественно свободные рибосомы.

Формирование всех рибосом, присутствующих в цитоплазматическом матриксе (как связанных с мембраной, так



Рис. 4.1. Электронная микрофотография рибосом на ультратонких срезах бактерий *Vibrio alginolyticus*.

Рибосомы видны как обильный гранулярный материал, заполняющий большую часть цитоплазмы. Предоставлена Л. Е. Бакеевой и Ю. С. Ченцовым, МГУ

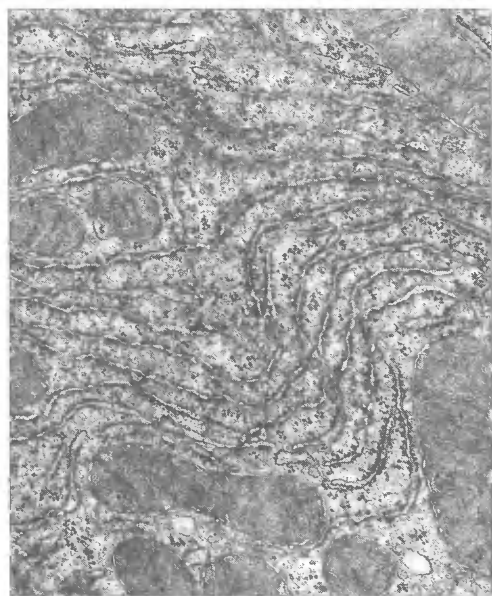


Рис. 4.2. Электронная микрофотография рибосом на ультратонком срезе клетки печени крысы. Рибосомы видны в основном как гранулы, прикрепленные к мембранам эндоплазматического ретикулума со стороны цитоплазматического матрикса, а также в виде свободных гранул, сгруппированных в кольцевые, спиралевидные или шпилькообразные структуры. Предоставлена Ф. Сикевичем, Рокфеллеровский университет, Нью-Йорк. Palade and Siekevits (1956) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 171—200

и свободных), происходит в ядрышке эукариотической клетки; естественно, их можно обнаружить и в этом отделе клеточного ядра. Кроме того, эукариотическая клетка содержит различные популяции рибосом в таких внутриклеточных органеллах, как митохондрии и,

в случае растительных клеток, хлоропласты. Рибосомы данных органелл отличаются от цитоплазматических тем, что они несколько меньше по размеру и имеют другой химический состав и функциональные характеристики. Эти рибосомы образуются непосредственно в органеллах.

4.3. Рибосомы прокариот и эукариот

В живой природе обнаруживается два основных типа рибосом (см. табл. 4.1). Все прокариотические организмы, включая грамположительные и грамотрицательные зубактерии, актиномицеты, синезеленые водоросли (цианобактерии) и архебактерии (археи), содержат так называемые 70S рибосомы. Эти рибосомы имеют коэффициент седиментации около 70 ед. Сведберга, их молекулярная масса составляет приблизительно 2 500 кДа, средний диаметр — 200—250 Å. По химическому составу они являются чистыми рибонуклеопротеидами, т.е. состоят только из РНК и белка. Соотношение масс РНК и белка в них составляет примерно 2:1; соответственно парциальный удельный объем 70S рибосом — около 0,60 см³/г, а плавучая плотность в растворе CsCl — 1,64 г/см³. РНК рибосомы существует главным образом в виде соли Mg²⁺; магний может составлять до 2 % сухой массы рибосомы. Кроме того, рибосомы могут содержать различные количества (до 2,5 % сухой массы) таких органических катионов, как спермин, спермидин, кадаверин и путресцин. Количество воды, связанной с 70S рибосомами, составляет примерно 1 г/г; другими словами, рибосомы в водной среде представляют собой довольно компактные, неразбухшие частицы. Морфология 70S рибосом прокариот почти универсальна, и только рибосомы архей обладают некоторыми особенностями, отличающими их от рибосом всех зубактерий, включая цианобактерии и актиномицеты (см. гл. 5).

Молекулярные характеристика двух основных типов рибосом

Характеристика	Рибосомы прокариотического типа — 70S рибосомы (эубактерии, актиномицеты, синезеленые водоросли, хлоропласты)	Рибосомы эукариотического типа — 80S рибосомы цитоплазмы (животные, грибы, растения)
Молекулярная масса	$2,5 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$
Размер	20—25 нм	25—30 нм
Соотношение РНК:белок	2:1	1:1

Цитоплазма клеток эукариотических организмов — животных, грибов, растений и простейших — содержит несколько более крупные 80S рибосомы (с коэффициентом седиментации около 80 ед. Сведберга). Молекулярная масса этих рибосом составляет 4000 кДа, а средний диаметр — около 250...300 Å. Подобно рибосомам прокариот, они содержат только два типа биополимеров — РНК и белок, но содержание белка в них значительно больше; соотношение масс РНК и белка в 80S рибосомах составляет примерно 1:1, парциальный удельный объем — около 0,65 см³/г, а плавучая плотность в растворе CsCl — 1,55...1,59 г/см³. Важно отметить, что абсолютное содержание как РНК, так и белка на одну частицу в 80S рибосомах существенно больше, чем в 70S рибосомах. Рибосомная РНК 80S рибосомы также связана с двухвалентными катионами — прежде всего Mg²⁺, а также с небольшим количеством полиаминов и диаминов, таких как спермин, спермидин и путресцин.

Морфологические характеристики всех 80S рибосом, независимо от того, получены ли они из животных, растений или низших эукариот, универсальны. Однако рибосомы хлоропластов высших растений принадлежат к классическому 70S типу, и их трудно отличить от рибосом эубактерий (в частности, цианобактерий, считающихся предшественниками хлоропластов) как по описанным выше характеристикам, так и по более тонким молекулярным особенностям. Митохондриальные рибосомы более разнообразны, и их свойства зависят от принадлежности организма к тому или иному таксону. Наиболее детально исследованы митохондриальные рибосомы грибов и млекопитающих. Митохондриальные рибосомы грибов (*Saccharomyces* или *Neurospora*) похожи на 70S рибосомы, но немного больше их по размеру («75S рибосомы») и содержат относительно больше белка; абсолютное содержание рибосомной РНК почти такое же, как в 70S рибосомах. Однако митохондриальные рибосомы млекопитающих значительно мельче типичных 70S рибосом, и абсолютное содержание рибосомной РНК на частицу в них также значительно ниже. Именно поэтому их иногда называют мини-рибосомами. Коэффициент седиментации мини-рибосом из митохондрий млекопитающих — всего около 55 ед. Сведберга, и общая масса рибосомной РНК на частицу составляет лишь 2/3 таковой типичных 70S рибосом. В то же время рибосомы митохондрий млекопитающих характеризуются относительно высоким относительным содержанием белка, так что по своему размеру они не сильно отличаются от типичных прокариотических рибосом. В целом, несмотря на некоторые необычные черты, рибосомы митохондрий млекопитающих по своим свойствам, включая функциональные характеристики, похожи на 70S рибосомы

прокариотических организмов (как в настоящее время полагают, предшественниками митохондрий млекопитающих были внутриклеточные паразитические зубактерии рода *Rickettsia*).

4.4. Полирибосомы

В процессе синтеза белка рибосома в каждый данный момент оказывается связанной лишь с ограниченным отрезком матричного полирибонуклеотида. Поскольку связанные с рибосомами части матрицы защищены от действия нуклеаз, их можно выделить после рибонуклеазной обработки комплекса рибосомы с матрицей. Было обнаружено, что эта часть матрицы имеет длину около 40 нуклеотидных остатков. В то же время длина кодирующей последовательности мРНК обычно превышает 300 нуклеотидов. Таким образом, чтобы прочесть всю кодирующую последовательность мРНК, рибосома должна последовательно пройти вдоль матрицы (или, что то же самое, пропустить ее через себя) в направлении от 5'-концевой части кодирующей последовательности к 3'-концевой части. Другими словами, рибосома должна работать как лентопотяжный механизм.

С какой же скоростью рибосома движется вдоль мРНК? В бактериальной клетке (например, *E. coli*) полипептид длиной 300—350 аминокислотных остатков синтезируется в течение приблизительно 20 секунд при температуре 37 °С, т. е. одна рибосома пробегает в секунду около 50 нуклеотидов. Скорость считывания мРНК у эукариот может достигать 30 нуклеотидов в секунду, но регуляторные воздействия обычно снижают ее до 5—10 полинуклеотидов в секунду (см. гл. 12).

Во время передвижения матричного полинуклеотида от 5'-конца к 3'-концу рибосома через некоторое время освобождает 5'-проксимальный отрезок матрицы. Становясь открытой, эта часть матрицы способна связать другую свободную рибосому. Вторая рибосома начинает считывание и также сдвигается с 5'-конце-

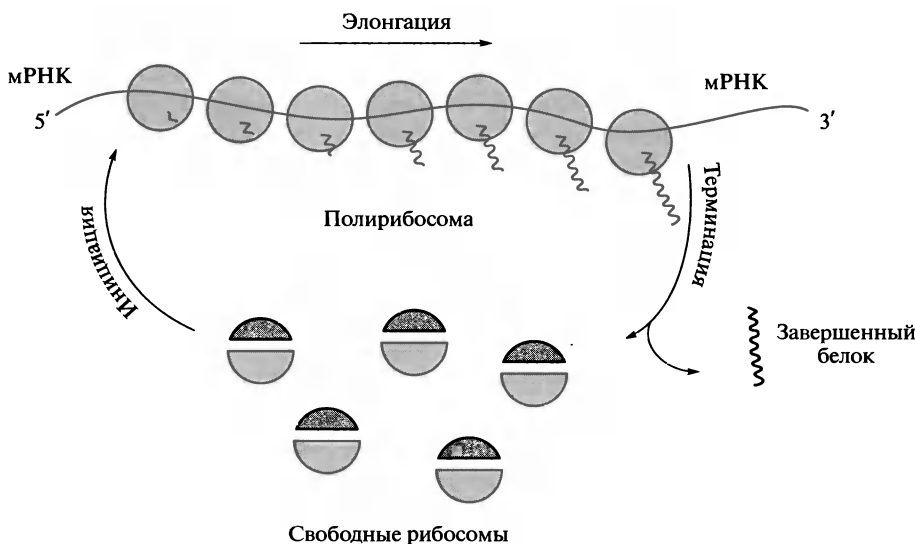


Рис. 4.3. Схематическое представление полирибосомы (полисомы) и эписикла трансляции

вого участка мРНК, давая возможность третьей рибосоме связаться с матрицей и начать считывание, и т. д. Таким образом, передвигаясь вдоль матрицы одна за другой, ряд рибосом одновременно выполняет считывание одной и той же информации, синтезируя идентичные полипептидные цепи (конечно, в любой данный момент полипептидные цепи на различных рибосомах находятся на разных стадиях формирования). Этот процесс схематично представлен на рис. 4.3, где рибосомы вблизи 3'-конца матрицы содержат почти полностью синтезированные полипептиды, рибосомы, расположенные в средней части мРНК, несут полипептиды, синтезированные наполовину, а рибосомы вблизи 5'-конца содержат короткие пептиды, элонгация которых только началась. Структура, в которой матричный полинуклеотид ассоциирован со многими транслирующими рибосомами, получила название *полирибосомы*, или *полисомы*.

Ранние наблюдения, сделанные с использованием электронной микроскопии в середине 1950-х гг., показали, что рибонуклеопротеидные гранулы (рибосомы) не распределены равномерно в цитоплазме клеток животных или в препаратах частиц, происходящих из микросом, а собраны в группы (Паладе и Сикевич, 1956). Свидетельства того, что такие группы состоят из транслирующих рибосом, которые связаны цепью мРНК, были получены одновременно несколькими группами в 1963 г. Было показано, что полирибосомы представляют собой форму активно транслирующих рибосом как в клетках эукариот (Рич с сотр., 1963; Гирер, 1963; Нолль с сотр., 1963; Дарнелл с сотр., 1963), так и у бактерий (Уотсон, 1963). Поскольку в бактериальных клетках из-за очень большой плотности рибосомного материала невозможно различить отдельные полирибосомы (см. рис. 4.1), сведения о структуре прокариотических полирибосом *in vivo* практически отсутствуют; обычно их представляют как что-то вроде бусинок на гибкой нитке мРНК (как на рис. 4.3), но неизвестно, так ли это на самом деле. Полирибосомы

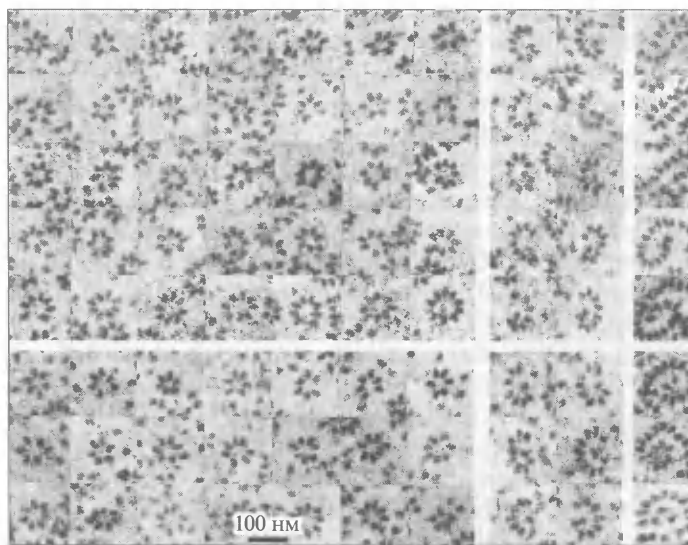


Рис. 4.4. Электронная микрофотография, показывающая циркулярную и спиралевидную формы полирибосом на мембране эндоплазматического ретикулума клетки гипоталамуса крысы. Предоставлена А. К. Кристенсеном, Мичиганский университет, США.

Christensen et al. (1987) *Amer. J. Anatomy* 178: 1–10

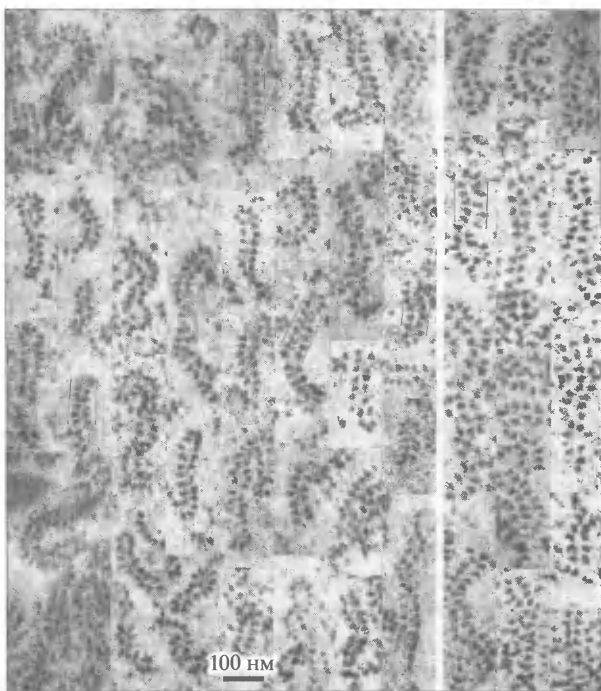


Рис. 4.5. Электронные микрофотографии длинных двурядных или шпилькообразных полирибосом на мембране эндоплазматического ретикулума тироидных эпителиальных клеток крысы.

Christensen and Bourne (1999) *Amer. J. Anatomy* 255: 116–129

же клеток эукариот хорошо различимы на ультратонких срезах тканей. Кроме того, их формирование может быть воспроизведено вне клетки, в так называемых бесклеточных системах трансляции (см. подразд. 4.7), основанных на экстрактах эукариотических клеток. Оказалось, что эукариотические полирибосомы являются довольно упорядоченными структурами, а отнюдь не подобны бусинам, беспорядочно рассеянными вдоль гибкой нити матричного полирибонуклеотида. Полирибосомы в клетках, секретирующих белок, связаны с мембранами эндоплазматического ретикулума и представлены главным образом циркулярными формами — либо круговой («О-подобной» или «G-подобной», в некоторых случаях спиралевидной) (рис. 4.4), либо, в случаях с длинными мРНК, двурядной или шпилькообразной (рис. 4.5) (см. Кристенсен с сотр., 1987, 1999). Свободные (не прикрепленные к мембране) полирибосомы тоже могут быть циркулярными (Шелтон и Куфф, 1966; Иошида и др., 1997). Длинные циркулярные полирибосомы, не сидящие на мембранах, также могут складываться в упорядоченные двойные ряды (рис. 4.6) (см. подразд. 14.3.9.1, а также Спирын и др., 2008).

В условиях, когда идет интенсивный синтез белка, расстояние между рибосомами вдоль цепи мРНК в полирибосоме может быть очень коротким, так что рибосомы вплотную прилегают друг к другу. Это означает, что на одну рибосому в полирибосоме может приходиться всего около 40 нуклеотидных остатков матрицы. В таком случае, каждые 1 — 10 секунд рибосома заканчивает синтез одной молекулы белка на 3'-конце кодирующей части мРНК и соответственно одна новая рибосома связывается с матрицей на 5'-конце и начинает движение по на-

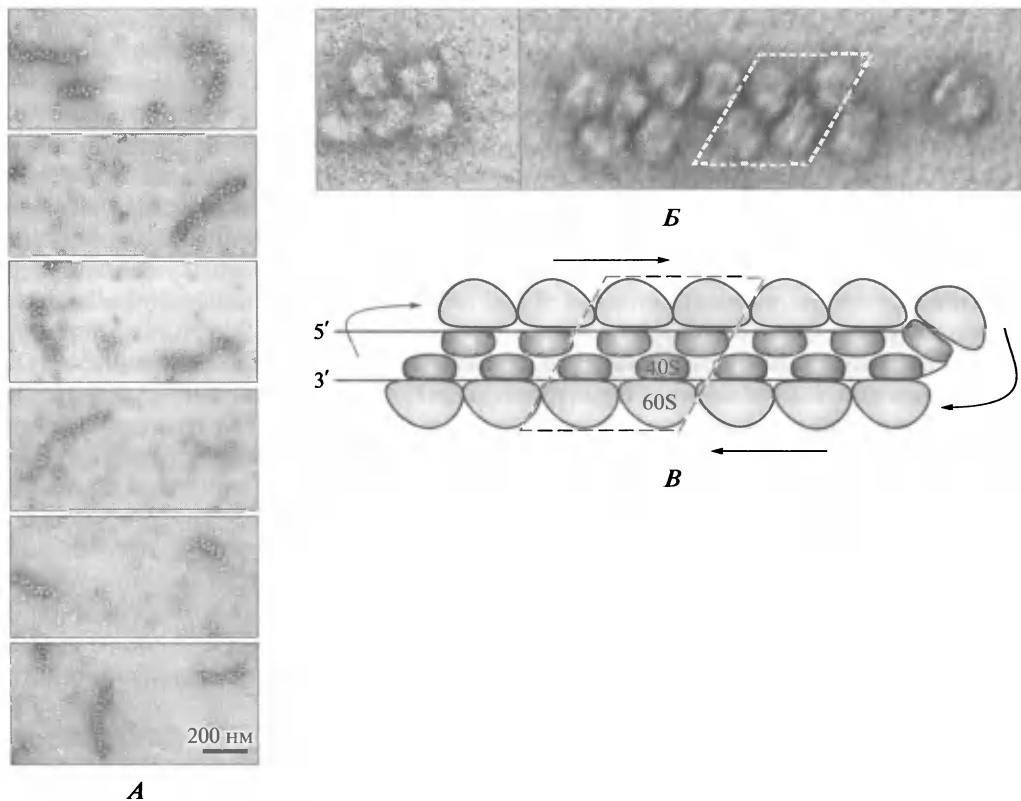


Рис. 4.6. Электронные микрофотографии свободных двурядных полирибосом, образованных в эукариотической бесклеточной системе трансляции на основе экстракта зародышей пшеницы; система запрограммирована мРНК, кодирующей люциферазу американского светлячка *Photinus pyralis* (1650 нуклеотидных остатков).

А: полирибосомы, сформированные в результате трансляции мРНК в течение 2 часов при 25 °С.

Б: увеличенная двурядная полирибосома.

В: схема укладки рибосом в двурядную полирибосому, демонстрирующая ее циркулярный характер: половины цикла слипаются вместе, образуя два антипараллельных ряда. Стрелки показывают направление движения рибосом вдоль цепи мРНК.

Koreina et al. (2008) *Nucleic Acids Res.* **36**: 2476–248

правлению к 3'-концу. Иногда вдоль цепи мРНК в полирибосоме можно видеть промежутки, не занятые рибосомами, а также свободные от рибосом «хвосты»; это может отражать наличие в мРНК каких-то барьеров, вызывающих временные остановки (паузы) во время элонгации, а в случаях свободных «хвостов» — присутствие нетранслируемых концевых последовательностей.

Существование в клетке полирибосом как транслирующей формы рибосом объясняет тот факт, что рибосом в клетке много, тогда как количество мРНК относительно невелико. Действительно, рибосомная РНК составляет около 80 % общей РНК клетки, в то время как содержание мРНК, как правило, не превышает 5 %. Это легко понять, если принять во внимание, что трансляционная машина клетки организована на основе полирибосом: одна мРНК транслируется многими рибосомами и одна часть транслируемой мРНК по массе соответствует примерно 100 частям рибосомной РНК.

4.5. Стадии трансляции: инициация, элонгация и терминация

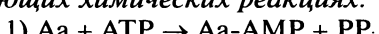
Рибосома начинает читать мРНК со строго определенной точки ее последовательности, а именно от начала ее кодирующей области. Эта точка, как правило, не совпадает с 5'-концевым нуклеотидом мРНК, а располагается на некотором, иногда значительном расстоянии от 5'-конца полинуклеотидной цепи. Рибосома должна каким-то образом узнавать начальную точку считывания, связываться с ней, а затем начинать трансляцию. Серия событий, обеспечивающих начало трансляции, называется *инициацией*. Для инициации необходим специальный инициаторный кодон, инициаторная тРНК и белки, называемые факторами инициации (см. гл. 14).

После стадии инициации рибосома последовательно считывает кодоны мРНК в направлении к ее 3'-концу. Прочтение мРНК подразумевает сопутствующий синтез полипептидной цепи, кодируемой мРНК. Синтез происходит на рибосоме путем последовательного добавления аминокислотных остатков к растущей полипептидной цепи; именно так осуществляется элонгация полипептида. Каждый новый аминокислотный остаток добавляется к карбоксильному концу (С-концу) пептида; другими словами, С-конец пептида является растущим. Добавление одного аминокислотного остатка соответствует считыванию одного триплета нуклеотидов. Весь процесс пошагового добавления аминокислотных остатков в соответствии с последовательностью кодонов в мРНК, представляющий собой собственно трансляцию кодирующей области мРНК, называется *элонгацией* (см. гл. 9—11).

Когда рибосома достигает терминирующего кодона мРНК, синтез полипептида прекращается. В присутствии терминирующего кодона рибосома не связывает никакой аминоацил-тРНК; вместо этого в процесс вступают специальные белки, называемые факторами терминации. Они вызывают освобождение синтезированного полипептида из рибосомы. Данная стадия называется *терминацией* трансляции (см. гл. 13). После терминации рибосома может либо «спрыгнуть» с мРНК, либо, в случае полицистронных мРНК, содержащих несколько независимых кодирующих последовательностей, продолжить скольжение вдоль нее без трансляции, вплоть до инициации на следующем цистроне. Когда рибосома переходит на новую цепь мРНК или встречает новый иницирующий кодон на полицистронной мРНК, происходит новая инициация. Итак, каждая рибосома проходит через полный цикл трансляции, включающий инициацию, элонгацию и терминацию; в результате такого *эпицикла* происходит считывание всей кодирующей последовательности мРНК и синтез полного полипептида. После этого рибосома может повторить цикл с той же или другой цепью мРНК, или с другими кодирующими последовательностями той же цепи.

4.6. Химические реакции и суммарный энергетический баланс биосинтеза белка

Итак, белки синтезируются из аминокислот в *трех последовательно протекающих химических реакциях*:



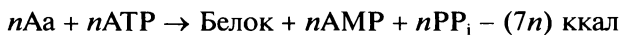
Первые две реакции катализируют аминоксил-тРНК-синтазы (см. рис. 3.10 и 3.11), а третью, завершающую, выполняют рибосомы. В первой реакции карбоксильная группа аминокислоты (Aa) реагирует с полифосфатной группой АТФ (АТФ), что приводит к замещению пиррофосфатного остатка (PP_i) аминоксил-ным остатком; так образуется *смешанный ангидрид*, аминоксиладенилат (Aa-AMP). Во второй реакции остаток аденилата (AMP) обменивается на тРНК (tRNA), и образуется сложноэфирная связь между карбоксильной группой аминокислотного остатка и гидроксильной группой рибозы концевой нуклеозидной тРНК, продукт реакции — аминоксил-тРНК (Aa-tRNA). Третья реакция — *реакция транспептидации*, катализируемая рибосомой, — представляет собой замещение остатком аминоксил-тРНК (Aa-tRNA) остатка тРНК (tRNA'), что приводит к образованию *амидной (пептидной)* связи между аминоксил-тРНК (Aa-tRNA) и карбоксильной группой другого аминоксил-ного остатка (Aa') (подробнее см. подразд. 8.5). Если полная молекула белка состоит из *n* аминокислотных остатков, то общий баланс реакций может быть записан следующим образом:



Далее в клетке происходит гидролиз пиррофосфата до ортофосфата, катализируемый пиррофосфатазой:



Свободная энергия гидролиза пиррофосфатных связей АТФ в стандартных условиях (ΔG°) составляет около -7 — -8 ккал/моль. Ангидридная связь аминоксиладенилата и сложноэфирная связь аминоксил-тРНК имеют примерно такие же значения свободной энергии гидролиза в стандартных условиях. Свободная энергия гидролиза пептидной связи бесконечно длинного полипептида (белка) в стандартных условиях составляет всего $-0,5$ ккал/моль. Таким образом, можно видеть, что суммарный процесс синтеза белка приводит к освобождению значительного количества свободной энергии; другими словами, биосинтез белка с использованием аминоксил-тРНК в качестве исходного субстрата является термодинамически спонтанным и энергетически обеспеченным процессом:

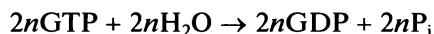


Если добавить к этому гидролиз пиррофосфата, то суммарный баланс энергии составляет $-15n$ ккал/моль. Таким образом, выигрыш свободной энергии в стандартных условиях для суммарной реакции синтеза белка, содержащего 200 аминокислотных остатков, составляет приблизительно 3000 ккал/моль.

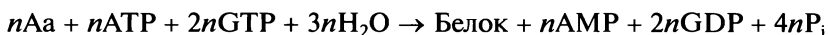
Анализ энергетического баланса каждой из трех реакций показывает, что первые две сами по себе не дают выигрыша свободной энергии (в стандартных условиях) и, следовательно, реакции на дорибосомных стадиях не должны быть значительно сдвинуты в сторону синтеза; сдвиг, однако, обеспечивается гидролизом пиррофосфата в параллельной реакции. Главное различие в уровнях свободной энергии между субстратами и продуктами обнаруживается в третьей реакции, т. е. сдвиг суммарной реакции в сторону синтеза обеспечивается главным образом за счет рибосомной стадии.

Несмотря на полное энергетическое обеспечение биосинтеза белка за счет расхода АТФ (или энергии сложноэфирной связи аминоксил-тРНК), рибосомная

стадия требует еще и гидролиза двух молекул ГТФ (GTP) на один аминокислотный остаток:



Это дает дополнительный выигрыш свободной энергии около 15 ккал на 1 моль аминокислоты (в стандартных условиях). Суммарная реакция всех химических стадий белкового синтеза может быть описана следующим образом:



Общий энергетический баланс суммарной реакции ΔG° равен приблизительно -30 ккал на 1 моль аминокислоты или -6000 ккал на 1 моль белка с длиной 200 аминокислотных остатков.

Здесь рассмотрена только химическая сторона процесса. Важно проанализировать, до какой степени эта оценка может быть изменена, если принять во внимание потерю энтропии, обусловленную упорядоченным расположением аминокислотных остатков вдоль цепи синтезированного белка и пространственной укладкой белковой структуры. Приблизительные оценки показывают, что потеря энтропии, обусловленная упорядоченным расположением аминокислот в полипептидной цепи, может внести лишь небольшую поправку, около 2,5 ккал на 1 моль аминокислоты. При пространственном упорядочивании цепи полипептидной молекулы потеря (уменьшение) энтропии значительна, но она компенсируется выигрышем энтальпии, возникающим вследствие нековалентного взаимодействия аминокислотных остатков.

Итак, в любом случае синтез белка сопровождается диссипацией большого количества свободной энергии. Значение освобождения такого необычно большого количества свободной энергии при биосинтезе белка является чрезвычайно интересной проблемой молекулярной биологии. Избыток свободной энергии, которая превращается в тепло и не используется для какой-либо накапливаемой полезной работы (в форме химических связей или неслучайного расположения остатков), должен играть важную роль в функционировании белоксинтезирующей системы. Очевидно, этот избыток необходим для обеспечения высоких скоростей и высокой надежности синтеза белка в живых системах.

4.7. Бесклеточные системы трансляции

Одним из наиболее замечательных открытий 1950-х гг. было установление того факта, что биосинтез белка не требует целостности клетки и может происходить после ее разрушения. Это открытие стало основой для создания так называемых *бесклеточных систем трансляции*. Включение аминокислот в белки в гомогенатах и экстрактах клетки, а также в свободных от клеток фракциях, содержащих микросомы, было продемонстрировано давно; первыми примерами были бесклеточные системы из тканей животных, в особенности из печени крысы, описанные Сикевичем в 1952 г. и Замечником в 1953 г. Вскоре после этого было показано, что включение аминокислот, соответствующее синтезу белка, в бесклеточной системе происходит на рибонуклеопротеидных частях или рибосомах (Замечник и др., 1955; Литтлфилд и Келлер, 1957). Бесклеточные белоксинтезирующие системы с бактериальными рибосомами (*E. coli*) были созданы почти одновременно в группах Циллига, Замечника и Тиссьера в 1959 и 1960 гг. Все эти

системы программировались эндогенной мРНК: рибосомы просто продолжали синтезировать полипептиды на молекулах мРНК, к которым они были прикреплены во время разрушения клетки. В 1961 г. Ниренберг и Маттей усовершенствовали систему, отделив рибосомы от эндогенной мРНК и введя экзогенную матрицу для синтеза белка. Одним из основных достижений этих исследователей было использование синтетических полирибонуклеотидных матриц, приготовленных с помощью полинуклеотидфосфорилазы, в том числе простых матриц, таких как поли(U) и поли(A). Именно это новшество позволило начать экспериментальную расшифровку генетического кода в 1961 г.

В настоящее время бесклеточные белоксинтезирующие системы могут быть реконструированы из хорошо охарактеризованных, высокоочищенных компонентов, включая рибосомы, матричные полинуклеотиды и набор аминоксил-тРНК или систему аминокислотирования тРНК, а именно тРНК, аминокислоты, АТФ и аминоксил-тРНК-синтетазы. Кроме того, система должна быть дополнена набором специфических белков, называемых факторами трансляции, а также ГТФ (табл. 4.2).

Простейшая бесклеточная рибосомная система синтеза полипептидов, которая может быть использована для исследования фундаментальных механизмов трансляции, включает только шесть высокомолекулярных компонентов и ГТФ. Например, поли(U)-программированная система может быть реконструирована из следующих ингредиентов: 70S рибосомы из *E. coli*; поли(U); Phe-тРНК; EF-Tu (белок с молекулярной массой 47 кДа); EF-Ts (белок с молекулярной массой 34 кДа); EF-G (белок с молекулярной массой 83 кДа); ГТФ. В результате трансляции поли(U) синтезируется полифенилаланин.

Для трансляции природной клеточной мРНК и вирусной РНК прокариотическая бесклеточная система должна включать также полный набор аминоксил-

Таблица 4.2

Компоненты бесклеточной системы синтеза белка

Рибосомы

мРНК (или ДНК + РНК-полимераза)

тРНК — полный набор

Аминокислоты

Аминоксил-тРНК-синтетазы

Факторы инициации (IF)

Факторы элонгации (EF)

Факторы терминации

} или безрибосомный
клеточный экстракт

АТФ, ГТФ (ЦТФ, УТФ)

АТФ-ГТФ-регенерирующая система (PEP + PK, или CP + CK, или AcP + AcK)

$Mg^{2+} = 1 - 10 \text{ мМ}$; $K^+/NH_4^+ = 50 - 200 \text{ мМ}$

pH — 7—8

Примечание. PEP — фосфоенолпируват; PK — пируваткиназа; CP — креатинфосфат; CK — креатинкиназа; AcP — ацетилфосфат; AcK — ацетилкиназа.

тРНК, три белка для инициации трансляции (IF1, IF2 и IF3) и три белка, необходимых для терминации трансляции (RF1, RF2 и RF3).

Когда в системе бесклеточной трансляции используются эукариотические 80S рибосомы, все соответствующие белковые факторы должны быть эукариотического происхождения. Они включают факторы элонгации, а именно eEF1, который эквивалентен бактериальным EF-Tu плюс EF-Ts, и eEF2, эквивалентный бактериальному EF-G, многочисленные факторы инициации (eIF1, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F, eIF5 и т.д.) и два фактора терминации (eRF1 и eRF3). Кроме того, для инициации трансляции в эукариотических системах требуется АТФ.

Однако обычно в рутинной лабораторной практике используются грубые клеточные экстракты, содержащие все эти эндогенные компоненты и факторы. Преинкубации клеточных экстрактов при физиологических температурах может быть достаточно для удаления из рибосом эндогенных мРНК за счет их расщепления эндогенными нуклеазами. (В некоторых случаях экстракт может быть кратковременно обработан экзогенной рибонуклеазой с ее последующим удалением или инактивацией.) Вакантные рибосомы экстракта взаимодействуют с экзогенной природной мРНК либо синтетическими полирибонуклеотидами в качестве матриц. Обработанные нуклеазами экстракты, содержащие рибосомы, тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы и трансляционные факторы, помимо экзогенных мРНК для синтеза полипептидов должны быть дополнены также аминокислотами, АТФ, ГТФ и АТФ/ГТФ-регенерирующей системой. Простейшими АТФ/ГТФ-регенерирующими системами могут быть либо фосфоенолпируват с пируваткиназой, либо креатинфосфат с креатинкиназой, либо ацетилфосфат с ацетилкиназой.

Альтернативной стратегией является использование частично фракционированного клеточного экстракта. Соответственно рибосомы и всю РНК удаляют из экстракта путем ультрацентрифугирования с последующей обработкой DEAE-целлюлозой, а остающуюся фракцию экстракта (так называемую фракцию S100, что означает «супернатант, приготовленный при 100 000 g») объединяют с очищенными рибосомами, тотальной тРНК и мРНК. В этом случае фракция S100 содержит все необходимые белковые факторы трансляции и аминоацил-тРНК-синтетазы. К смеси нужно добавить также аминокислоты, АТФ, ГТФ и АТФ/ГТФ-регенерирующую систему.

В случае прокариотических систем легко производить мРНК непосредственно в трансляционной системе, а не добавлять изолированную мРНК, поскольку экстракты прокариотических клеток содержат РНК-полимеразу. К свободным от ДНК экстрактам вместо мРНК добавляют соответствующую ДНК в виде плазмиды, изолированного гена, синтетического фрагмента ДНК или вирусной ДНК, и нужная мРНК синтезируется эндогенной РНК-полимеразой *in situ* (Зюбей с сотр., 1967; Голд с сотр., 1969). Тогда рибосомы начинают трансляцию еще растущих цепей мРНК до завершения их синтеза. Поэтому такие системы называют *сопряженными системами транскрипции-трансляции*. Конечно, сопряженные системы должны быть дополнены всеми четырьмя нуклеозидтрифосфатами, необходимыми для синтеза РНК, а не только АТФ и ГТФ, которые требуются для трансляции.

Эукариотические экстракты получают из цитоплазматической фракции клеток, так что они лишены эндогенной РНК-полимеразной активности. Это ограничение можно обойти путем добавления к эукариотическому экстракту прокариотической РНК-полимеразы.

Для того чтобы производить мРНК *in situ*, обычно добавляется РНК-полимераза бактериофагов T7 или SP6 и используются ДНК с соответствующими T7-или SP6-промоторами. Однако в этом случае между транскрипцией и трансляцией нет реального сопряжения, поскольку РНК-полимеразы бактериофагов работают значительно быстрее, чем система трансляции. Тем не менее получаемые эукариотические системы *совмещенной* (но не сопряженной!) транскрипции-трансляции практичны и продуктивны.

Ионная сила и особенно надлежащая концентрация Mg^{2+} являются важными факторами для функционирования бесклеточной системы. Обычный интервал концентраций Mg^{2+} , в котором рибосомы активны в бесклеточной системе, — от 3 до 20 мМ; оптимум находится где-то между этими значениями и зависит от происхождения рибосом и концентрации моновалентных катионов (K^+ или NH_4^+), а также от концентрации ди- и полиаминов. Кроме того, оптимум концентрации Mg^{2+} зависит также от температуры инкубации. Как правило, в смеси, где происходит трансляция, должны присутствовать тиоловые соединения, такие как меркаптоэтанол, дитиотреит или глутатион, для поддержания восстановленного состояния белковых факторов трансляции.

Необходимо отметить один принципиальный недостаток бесклеточных систем трансляции и транскрипции-трансляции: в отличие от синтеза белка *in vivo* они характеризуются коротким временем жизни и поэтому имеют низкий выход синтеза белка. Это ограничение делает их полезными только для аналитических целей и неприемлемыми для препаративного синтеза полипептидов и белков. Действительно, бактериальная (*E. coli*) бесклеточная система обычно активна в течение 10, максимум 30 минут при 37 °С. Время жизни систем, основанных на лизате ретикулоцитов кролика или экстракте зародышей пшеницы, может быть продлено до 3—4 часов.

В конце 1980-х гг. было обнаружено, что указанный недостаток можно преодолеть, если проводить инкубацию бесклеточной системы не в пробирке с фиксированным объемом, а в условиях непрерывного удаления продуктов синтеза (таких как синтезированные полипептиды, АМФ, ГДФ, неорганические фосфаты) и непрерывного снабжения расходуемыми субстратами (аминокислотами, АТФ и ГТФ) (Спирин и др., 1988). Этого можно достигнуть, используя пористые барьеры (мембраны), ограничивающие реакцию смесь. Один из способов — пропускание потока субстратсодержащих растворов через реактор (CFCF — *бесклеточная система в непрерывном потоке*). В таком случае выходящий поток уносит через микропористый барьер (ультрафильтрационную мембрану) продукты реакции (включая и синтезированный белок, если выбрана подходящая мембрана). Интересно, что компоненты, участвующие в трансляции (или транскрипции-трансляции), сохраняются в объеме реактора даже в том случае, когда некоторые из них (в индивидуальном состоянии) меньше, чем барьерные (мембранные) поры. Это позволяет предполагать, что компоненты белоксинтезирующей системы в функциональном состоянии представляют собой большие динамические комплексы. Другой способ, основанный на том же принципе, — помещение реакционной смеси в диализный мешок или другое диализное устройство и диализ против большого объема субстратсодержащего раствора; во время инкубации низкомолекулярные продукты удаляются, а новые порции потребляемого субстрата проходят к месту синтеза через диализную мембрану (SECF — *бесклеточная система с непрерывным обменом*). В этом случае синтезированный белок удерживается в реакторе. Время

жизни описанных систем, особенно проточной, увеличивается по крайней мере до 50 часов как в прокариотических, так и в эукариотических экстрактах. Выход синтезированного белка в подобных системах непрерывного действия может достигать нескольких миллиграммов на 1 мл объема реактора.

Подробное описание принципов и методов синтеза белков в бесклеточных системах, а также исторический обзор развития этих методов даны в книге под редакцией Спирина и Сварца (Spirin, A. S. and Swartz, J. R., eds., 2007).

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 4

- Brachet, J. (1942). La localization des acides pentosenucleiques dans les tissus animaux et les oeufs d'amphibies en voie de development. *Arch. Biol.* **53**: 207—257.
- Casperson, T. (1941). Studien uber den Eiweissumsatz der Zelle. *Naturwissenschaften* **29**: 33—43.
- Chao, F.-C., and Schachmann, H. K. (1956). The isolation and characterization of a macromolecular ribonucleoprotein from yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **61**: 220—230.
- Claude, A. (1940). Particulate components of normal and tumor cells. *Science* **91**: 77—78.
- Christensen, A. K., and Bourne, C. M. (1999). Shape of large bound polysomes in cultured fibroblasts and thyroid epithelial cells. *Amer. J. Anatomy* **255**: 116—129.
- Christensen, A. K., Kahn, L. E., and Bourne, C. M. (1987). Circular polysomes predominate on a rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammatropes in the rat. *Amer. J. Anatomy* **178**: 1—10.
- De Vries, J. K., and Zubay, G. (1967). DNA-directed protein synthesis. II. The synthesis of the α -fragment of the enzyme β -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**: 1010—1012.
- Gierer, A. (1963). Function of aggregated reticulocyte ribosomes in protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **6**: 148—157.
- Gold, L. M., and Schweiger, M. (1969). Synthesis of phage-specific α - and β -glycosyl transferases directed by T-even DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**: 892—898.
- Kopeina, G. S., Afonina, Z. A., Gromova, K. V., Shirokov, V. A., Vasiliev, V. D., and Spirin, A. S. (2008). Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucl. Acids Res.* **36**: 2476—2488.
- Lamborg, M., and Zamecnik, P. C. (1960). Amino acid incorporation by extracts of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **42**: 206—211.
- Littlefield, J. W., and Keller, E. B. (1957). Incorporation of C^{14} amino acids into ribonucleoprotein particles from the Erlich mouse ascites tumor. *J. Biol. Chem.* **224**: 13—30.
- Littlefield, J. W., Keller, E. B., Gross, J., and Zamecnik, P. C. (1955). Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from liver of the rat. *J. Biol. Chem.* **217**: 11—123.
- Matthaei, H., and Nirenberg, M. W. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon RNA prepared from ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**: 184—189.
- McQuillen, K., Roberts, R. B., and Britten, R. J. (1959). Synthesis of nascent protein by ribosomes in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**: 1437—1447.
- Nirenberg, M. W., and Matthaei, H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 1558—1602.
- Palade, G. E. (1955). A small particle component of cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**: 59—68.
- Palade, G. E., and Siekevits, P. (1956). Liver microsomes: An integrated morphological and biochemical study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**: 171—200.
- Palade, G. E., and Siekevits, P. (1956). Pancreatic microsomes: An integrated morphological and biochemical study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**: 671—691.

- Penman, S., Scherrer, K., Becker, Y., and Darnell, J. (1963). Polyribosomes in normal and poliovirus-infected HeLa cells and their relationship to messenger-RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 654—662.
- Petermann, M. L., and Hamilton, M. G. (1957). The purification and properties of cytoplasmic ribonucleoprotein from rat liver. *J. Biol. Chem.* **224**: 725—736.
- Schachman, H. K., Pardee, A. B., and Stainer, R. Y. (1952). Studies on the macromolecular organization of microbial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **38**: 245—260.
- Schachtschabel, D., and Zillig, W. (1959). Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine. I. Über den Einbau ¹⁴C-markierter Aminosäuren ins Protein zellfreier Nucleoprotein-Enzym-Systeme aus *E. coli* B. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **314**: 262—275.
- Shelton, E., and Kuff, E. L. (1966). Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **22**: 23—31.
- Siekevitz, P. (1952). Uptake of radioactive alanine in vitro into the proteins of rat liver fractions. *J. Biol. Chem.* **195**: 549—565.
- Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Yu., and Alakhov, Yu. B. (1988). A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* **242**: 1162—1164.
- Tissieres, A., and Watson, J. D. (1958). Ribonucleoprotein particles from *E. coli*. *Nature* **182**: 778—780.
- Tissieres, A., Schlesinger, D. and Gros, F. (1960). Amino acid incorporation into proteins by *E. coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**: 1450—1463.
- Ts'o, P. O. P., Bonner, J., and Vinograd, J. (1956). Microsomal nucleoprotein particles from pea seedlings. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**: 451—465.
- Warner, J. R. Knopf, P. M., and Rich, A. (1963). A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 122—129.
- Watson, J. D. (1963). The involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science* **140**: 17—26.
- Wettstein, F. O., Staehelin, T., and Noll, H. (1963). Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: Characterization of ergosome. *Nature* **197**: 430—435.
- Yoshida, T., Wakiyama, M., Yazaki, K., and Miura, K. (1997). Transmission electron and atomic force microscopic observation of polysomes on carbon-coated grids prepared by surface spreading. *J. Electron Microscopy* (Japan) **46**: 503—506.
- Zamecnik, P. C. (1953). Incorporation of radioactivity from D,L-leucine-1-C¹⁴ into proteins of rat liver homogenates. *Fed. Proc.* **12**: 295.
- Zamecnik, P. C., and Keller, E. B. (1954). Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins. *J. Biol. Chem.* **209**: 337—354.
- Монографии, сборники
- Roberts, R. B., ed. (1958). *Microsomal particles and protein synthesis*, First Symposium of the Biophysical Society at The Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass., February 5, 6, and 8, 1959. Pergamon Press, London — New York — Paris — Los Angeles.
- Spirin, A. S., and Swartz, J. R., eds. (2007). *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany.

Глава 5
МОРФОЛОГИЯ РИБОСОМЫ

5.1. Размер, внешний вид и подразделение на субъединицы

Под электронным микроскопом изолированные бактериальные рибосомы выглядят в первом приближении как компактные округлые частицы с линейными размерами от 20 до 25 нм (рис. 5.1) или несколько больше — до 30 нм — в случае рибосом эукариот. Однако более детальный анализ морфологии рибосом обнаруживает довольно сложный поверхностный рельеф частиц, более или менее похожий у рибосом всех организмов и клеток, как прокариотических, так и эукариотических (Холл и Слейтер, 1959; Хаксли и Зьюбей, 1960; Васильев, 1971; Нономура, Блобель и Сабатини, 1971; Лейк, 1976; Штоффлер и др., 1981; Васильев, Спирин и др., 1983).

Характерной особенностью одной из проекций рибосомы является борозда, которая делит ее на две неравные части (рис. 5.2). Это отражает тот факт, что рибосома состоит из двух разделяемых субчастиц, или рибосомных субъединиц. В определенных условиях, например, если концентрация ионов магния в среде достаточно низка, рибосома диссоциирует на две субъединицы, соотношение масс которых составляет около 2:1 (рис. 5.3). Прокариотическая 70S рибосома диссо-

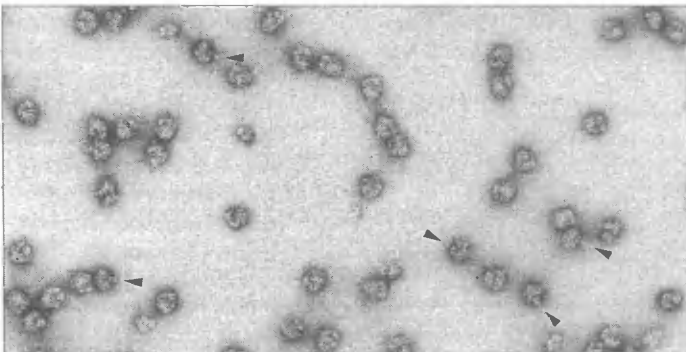


Рис. 5.1. Электронная микрофотография препарата изолированных 70S рибосом *Escherichia coli*.

Для достижения необходимого контраста изолированные частицы наносили на ультратонкую углеродную пленку и обрабатывали раствором уранилацетата, после чего высушивали. Рибосомные частицы имеют более низкую электронную плотность, чем уранилацетат, и их рельеф выявляется на фоне окружающего каждую частицу электронно-плотного уранилацетата (*негативный контраст*). Стрелки указывают на боковой выступ — так называемый L7/L12-стержень, или «палец», большой рибосомной субъединицы (см. текст). Фотография предоставлена В. Д. Васильевым

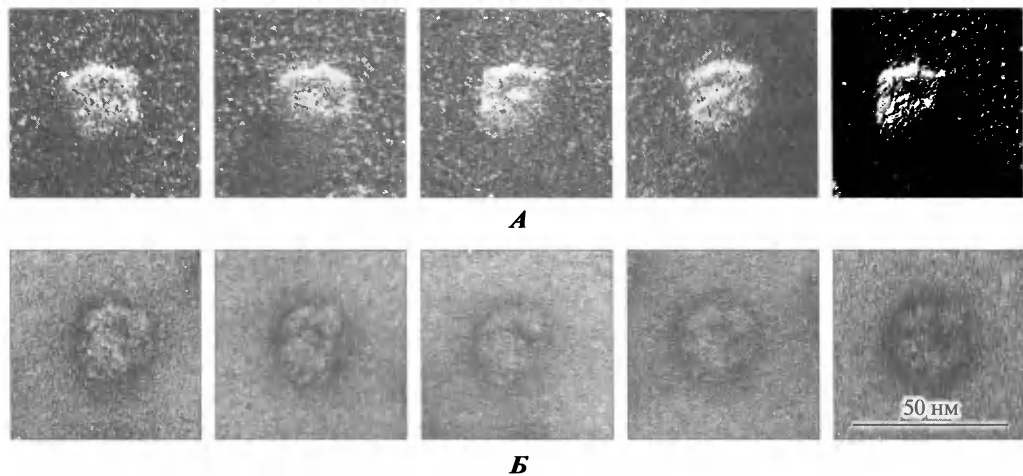


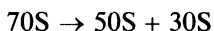
Рис. 5.2. Электронные микрофотографии индивидуальных 70S рибосом *Escherichia coli*, иллюстрирующие подразделение рибосомной частицы на две неравные субчастицы, или субъединицы. Изображения ориентированы так, что малая субъединица находится сверху, а большая — снизу.

А: рибосомные частицы, контрастированные методом напыления металла («оттененные металлом»). В этом случае для достижения контраста суспензию изолированных рибосом наносили на углеродную пленку и высушивали в вакууме из замороженного состояния, после чего напыляли атомы металла (вольфрама или сплава вольфрама с рением) с помощью вакуумного испарителя под углом 75° к поверхности пленки.

Б: рибосомные частицы, контрастированные, как описано в подписи к рис. 5.1 (негативно контрастированные).

Фотографии предоставлены В.Д. Васильевым

цирует на субъединицы с коэффициентами седиментации 50 ед. Сведберга (молекулярная масса 1650 кДа) и 30 ед. Сведберга (молекулярная масса 850 кДа):



Эукариотическая 80S рибосома диссоциирует на 60S и 40S субъединицы:



Диссоциация может быть также индуцирована высокими концентрациями (0,5 М и выше) одновалентных катионов, в частности K^+ или NH_4^+ , характерными для внутриклеточной среды, или значительно меньшими концентрациями Na^+

Рис. 5.3. Седиментационный профиль препарата изолированных 70S рибосом *Escherichia coli* и продуктов их диссоциации, вызванной понижением концентрации Mg^{2+} в среде.

А: 70S рибосомы в 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NH_4Cl .
Б: рибосомные 30S и 50S субъединицы в 1 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NH_4Cl

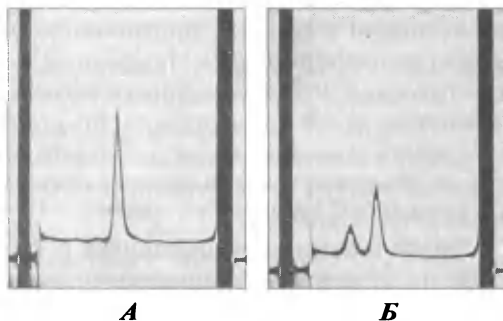
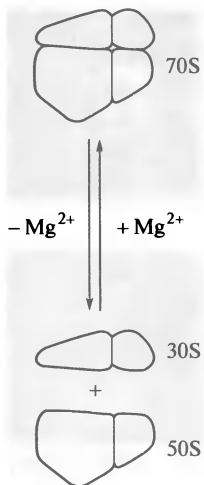


Рис. 5.4. Схема диссоциации рибосом на субъединицы при понижении концентрации Mg^{2+} и реассоциации субъединиц при обратном повышении концентрации Mg^{2+}



или Li^+ . Очевидно, диссоциирующий эффект одновалентных солей обусловлен, прежде всего, вытеснением части Mg^{2+} из рибосомных РНК, межсубъединичные участки которых обеспечивают контакт и ассоциацию двух рибосомных субъединиц. Интересно, что диссоциацию рибосомы можно вызвать и мочевиной, что указывает на участие других — не только электростатических — сил в удержании двух субъединиц вместе. Диссоциация 70S рибосом *E. coli* как результат понижения концентрации Mg^{2+} в растворе, наблюдаемая по изменению профиля седиментации, показана на рис. 5.3.

Диссоциация рибосом обратима. Восстановление надлежащей концентрации Mg^{2+} и удаление диссоциирующих агентов приводит к реассоциации субъединиц рибосомы (рис. 5.4). Ассоциации субъединиц содействуют Ca^{2+} , диамины и полиамины, а также низкомолекулярные спирты, такие как метанол и этанол.

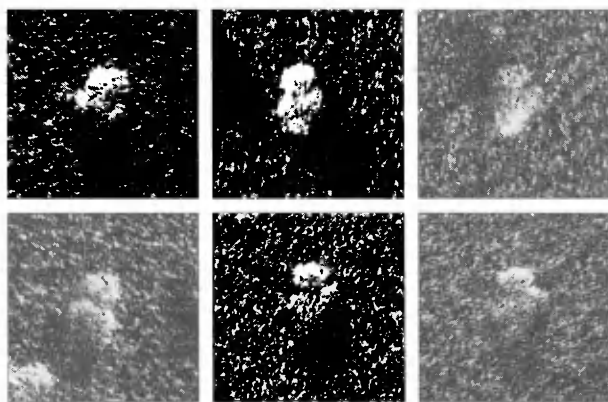
После диссоциации субъединицы рибосом могут быть разделены в препаративной ультрацентрифуге, а затем исследованы по отдельности. Было обнаружено, что каждая из субъединиц имеет уникальную асимметричную форму, которая будет описана ниже.

5.2. Малая субъединица

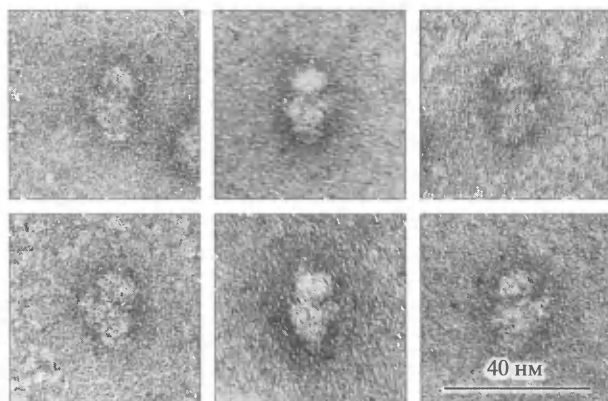
Различные электронно-микроскопические проекции бактериальной 30S субъединицы рибосомы и соответствующие морфологические модели этой субъединицы представлены на рис. 5.5 (см. также Васильев, 1974; Лейк, 1976; Васильев, Биелька и др., 1989). Можно видеть, что 30S субъединица имеет несколько удлиненную форму и ее максимальный размер достигает 23 нм. Субъединица подразделена на доли, которые обычно обозначаются как головка («head», H), тело («body», B) и боковая лопасть, или платформа (рис. 5.5, 1 и 3). Борозда, отделяющая головку от тела, видна на микрофотографиях достаточно отчетливо.

40S субъединица эукариотической рибосомы имеет похожую морфологию, хотя нужно упомянуть о двух дополнительных деталях ее структуры. Во-первых, это более выраженный боковой выступ головки, или «эукариотический клюв», направленный в сторону, противоположную боковой лопасти тела (при более высоком разрешении — см. подразд. 5.5 — «клюв» выявляется и на головке прокариотической 30S субъединицы, но он существенно менее выражен, чем на эукариотической 40S субъединице). Во-вторых, конец тела, дистальный по отношению к головке, заметно раздвоен, что обусловлено присутствием некоторой дополнительной массы; это раздвоение обозначается как «эукариотические ноги» (см. ниже, рис. 5.6, Б).

Более надежная информация о субъединицах рибосомы может быть получена из электронных микрофотографий при анализе усредненных, а не индивидуальных изображений. Усреднение позволяет избавиться от статистическо-



А



Б



1

2

3

В

Рис. 5.5. Электронные микрофотографии индивидуальных 30S рибосомных субъединиц *Escherichia coli* и морфологическая модель 30S субъединицы в трех проекциях.

А: частицы, оттененные металлом, как описано в подписи к рис. 5.2, **А**.

Б: частицы, негативно контрастированные уранилацетатом, как описано в подписи к рис. 5.1.

В: морфологическая модель частицы, выведенная из электронных микрофотографий.

1: вид с внешней стороны, обращенной в раствор (Н — «головка» субъединицы, В — ее «тело»).

2: вид с боку.

3: вид с контактирующей стороны, обращенной к 50S субъединице.

Фотографии предоставлены В.Д. Васильевым.

Vasiliev (1974) *Acta Biol. Med. Germ.* **33:** 779—793

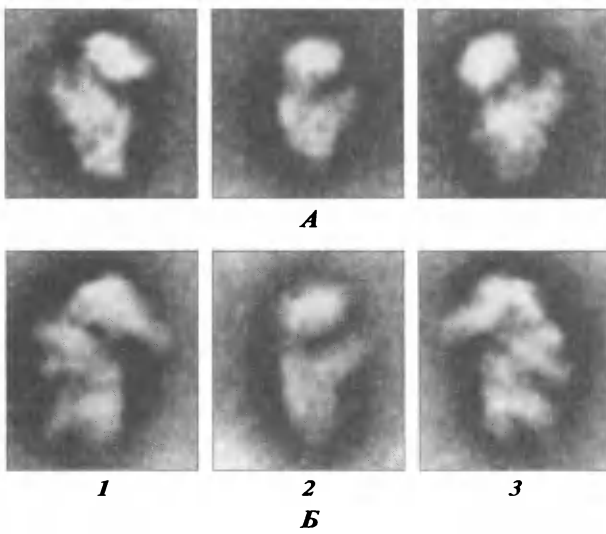
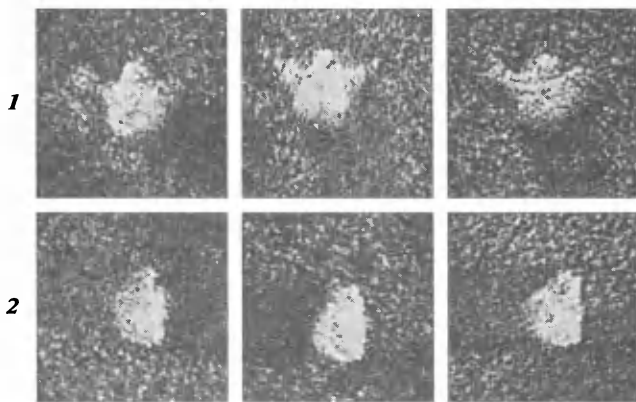


Рис. 5.6. Усредненные изображения негативно контрастированных бактериальных 30S (А) и эукариотических 40S (Б) рибосомных субъединиц в тех же трех проекциях (1—3), что на рис. 5.5. Фотографии предоставлены В.Д. Васильевым

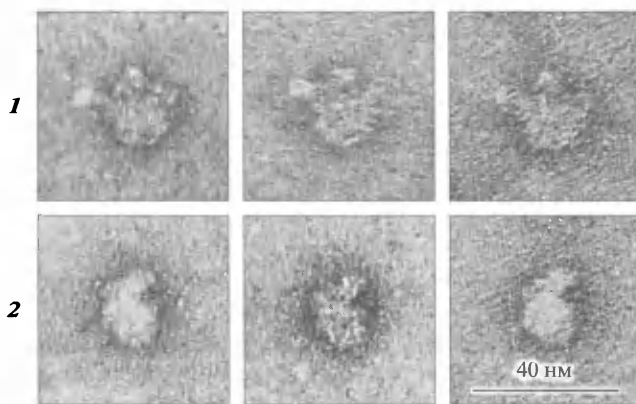
го шума электронно-микроскопических изображений, что приводит к лучшему выявлению общих черт данного типа частиц. Для усреднения изображения оцифровывают с использованием микроденситометра, а затем выполняют компьютерный анализ набора однотипных изображений частицы. Изображения, удовлетворяющие определенным критериям идентичности, совмещают друг с другом и суммируют, в результате чего получают усредненное изображение. Все неповторяющиеся детали оригинальных изображений, например вариации распределения контрастера вокруг частицы, структурные изменения, вызванные радиацией, а также вариации в пленке-подложке, исчезают, и на усредненном изображении остаются только общие элементы. Примеры такого усреднения изображений негативно контрастированных 30S субъединиц *E. coli* представлены на рис. 5.6, А. Все три проекции показывают, что головка отделена от остальной части субъединицы отчетливой глубокой бороздой, так что «шея» субъединицы получается довольно тонкой. Пример усредненного изображения негативно контрастированной 40S субъединицы рибосомы печени крысы представлен на рис. 5.6, Б. Малая 30S субъединица рибосомы архей (архебактерий) имеет промежуточную морфологию между морфологией 30S субъединицы эубактерий и 40S субъединицей эукариот: у архейной субъединицы есть характерный выраженный «клюв» на головке, но нет столь выраженных «ног» на конце тела.

5.3. Большая субъединица

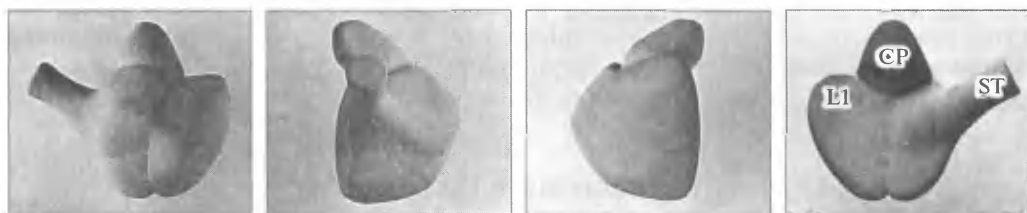
Различные проекции бактериальной 50S субъединицы и ее модель показаны на рис. 5.7 (см. также Лейк, 1976; Васильев и др., 1983). Эта субъединица более изометрична по сравнению с малой и имеет линейные размеры от 20 до 23 нм во всех направлениях. В ней можно различить три периферических выступа: цен-



A



Б



В

Рис. 5.7. Электронные микрофотографии индивидуальных 50S рибосомных субъединиц *Escherichia coli* и морфологическая модель 50S субъединицы в четырех проекциях.

1: так называемая коронобразная проекция, когда частица обращена к зрителю своей внешней выпуклой стороной.

2: боковая проекция, когда частица обращена к зрителю своим L1-выступом.

A: частицы, оттененные металлом, как описано в подписи к рис. 5.2, A.

Б: частицы, негативно контрастированные уранилцетатом, как описано в подписи к рис. 5.1.

В: морфологическая модель частицы, выведенная из электронных микрофотографий и обращенная к зрителю четырьмя разными сторонами.

CP — центральный выступ, или «головка» субъединицы (на всех четырех проекциях — вверху); L1 — боковой выступ, или боковая лопасть, где расположен рибосомный белок L1; ST — боковой выступ, или «стержень», или «палец», где размещается рибосомный белок L7/L12.

Vasiliev et al. (1983) *J. Mol. Biol.* **171**: 561—569

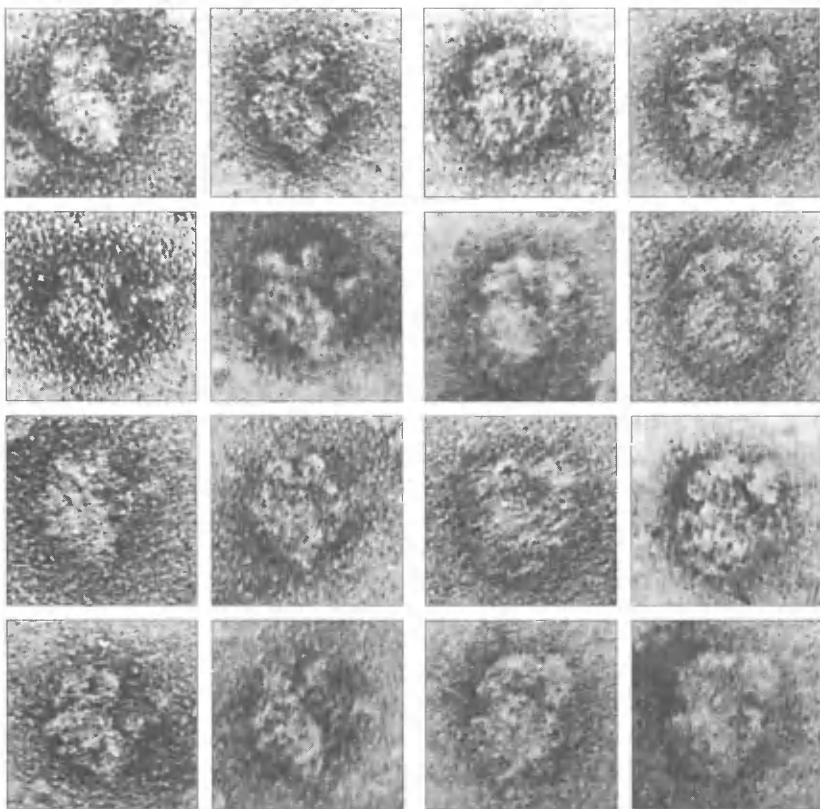
Центральный выступ (central protuberance, CP), который может быть назван также головкой большой субъединицы; боковой пальцеобразный выступ, который часто называют L7/L12-стержнем (stalk, ST); боковой выступ, расположенный по другую сторону центрального выступа и иногда называемый L1-лопастью (два латеральных выступа 50S рибосомной субъединицы содержат рибосомные белки L7/L12 и L1 соответственно; см. гл. 7). Следует отметить, что центральный протуберанец (CP), или головка, большой субъединицы отделен от остальной ее части довольно глубокой бороздой и что борозда глубже со стороны L1-лопасти, чем со стороны L7/L12-стержня. Тело субъединицы несколько раздвоено со стороны, противоположной головке. Эукариотическая 60S субъединица имеет те же самые морфологические черты.

5.4. Ассоциация субъединиц в полную рибосому

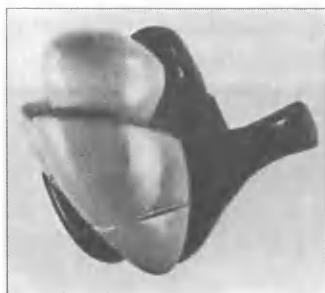
В полной рибосоме субъединицы взаимодействуют друг с другом строго определенным образом. Именно уплощенная сторона большой (50S или 60S) субъединицы участвует в формировании контакта с малой субъединицей; если на большую субъединицу смотреть с уплощенной стороны и головку субъединицы ориентировать вверх, то L7/L12-стержень окажется справа, а L1-выступ слева (рис. 5.8, *1*). Объединение субъединиц в 70S рибосому осуществляется по принципам «головка к головке» и «боковая лопасть к боковой лопасти». Ассоциация «головка к головке» ясно видна на электронно-микроскопических фотографиях 70S рибосомы и в другой — боковой — проекции полной рибосомы (см. рис. 5.8, *А*, *2*). Электронно-микроскопическое изображение «перекрывающейся» проекции полной рибосомы показывает, что 30S субъединица закрывает только часть уплощенной стороны 50S субъединицы (см. рис. 5.8, *А*, *1*). Область у основания L7/L12-стержня остается незакрытой. Именно в этой области и в полости (канале) между «шеями» располагаются функционально важные участки рибосомы (см. гл. 8). Фотография модели 70S рибосомы с 30S и 50S субъединицами, ассоциированными по типу «головка к головке» и «боковая лопасть к боковой лопасти», сделанная на основе изображений с низким разрешением, представлена на рис. 5.8, *Б*.

5.5. Структура рибосомы с низким разрешением

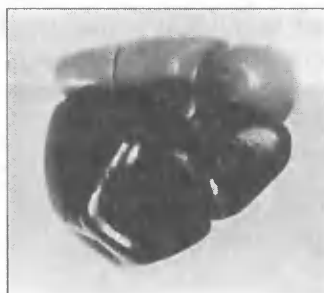
Около десяти—пятнадцати лет назад в изучении рибосом с помощью метода электронной микроскопии был достигнут значительный прогресс. Он был связан с дальнейшим развитием методов получения изображений и техники их обработки. Так, развитие криоэлектронной микроскопии позволило увидеть рибосомы в тонкой пленке стекловидного льда, без какого-либо контрастирования и, таким образом, исследовать не только их морфологию, но и внутреннюю структуру. Изображения были получены при низкой дозе облучения и оптимальном использовании фазового контраста. Стекловидное вещество льда сохраняет частицы в полностью гидратированном состоянии, вследствие чего становится возможным изучение минимально искаженной структуры рибосом. Была создана специальная компьютерная программа для трехмерной реконструкции структуры рибосомы, использующая несколько тысяч изображений. Трехмерная реконструкция объ-



A



1



2

Б

Рис. 5.8. Электронные микрофотографии индивидуальных 70S рибосом *Escherichia coli* (**A**; частицы контрастированы уранилацетатом, как описано в подписи к рис. 5.1) и морфологическая модель 70S рибосомы (**Б**).

1: так называемая перекрывающаяся проекция, когда 30S субъединица обращена к зрителю и накрывает часть поверхности 50S субъединицы.

2: неперекрывающаяся, или боковая, проекция, когда к зрителю обращена сторона с L7/L12-стержнем.

Фотографии предоставлены В.Д. Васильевым.
 Vasiliev et al. (1983) *FEBS Letters* **155**: 167–172

екта основана на использовании набора его проекций, наблюдаемых с различных направлений. В электронной микроскопии, в отличие от медицинской рентгеновской компьютерной томографии, необходимые проекции не могут быть получены путем последовательной регистрации изображения одной и той же частицы под разными углами по отношению к пучку электронов. Для предотвращения радиационного повреждения каждая частица при исследовании может быть «освещена» пучком электронов только один раз. Поэтому полный набор данных, необходимый для трехмерной реконструкции, собирается с изображений различных проекций, зарегистрированных на электронно-микроскопических снимках однократно экспонированных частиц. Различные проекции возникают случайным образом, и проблема заключается в том, чтобы определить ориентацию частиц для каждой из них в общей системе координат. Для решения этой проблемы разными группами исследователей были использованы различные подходы, что привело к трехмерной реконструкции бактериальной рибосомы с разрешением около 2,5 нм (Франк и др., 1995; ван Хил и др., 1995).

Общая форма новых моделей структуры 70S рибосомы оказалась очень близка к той форме, что была рассмотрена ранее и получена путем визуальной интерпретации изображений контрастированных рибосом. Хотя поверхность рибосомы выглядит значительно менее гладкой, основные характерные морфологические черты обеих субъединиц, выявленные ранее, здесь тоже хорошо узнаваемы. Малая субъединица состоит из головки, боковой лопасти и тела, а большая субъединица может быть аппроксимирована полусферой с тремя выступами. Наиболее важной новой чертой, увиденной на реконструированных моделях неконтрастированной, встроенной в лед рибосомы, было наличие большой полости между рибосомными субъединицами, располагающейся в области их «шей». Этого межсубъединичного пространства достаточно для того, чтобы там могли разместиться молекулы тРНК, и действительно вскоре было показано, что эта полость служит в качестве тРНК-связывающего кармана рибосомы. Другое важное заключение, сделанное на основании сравнения новых моделей изолированных субъединиц и полных

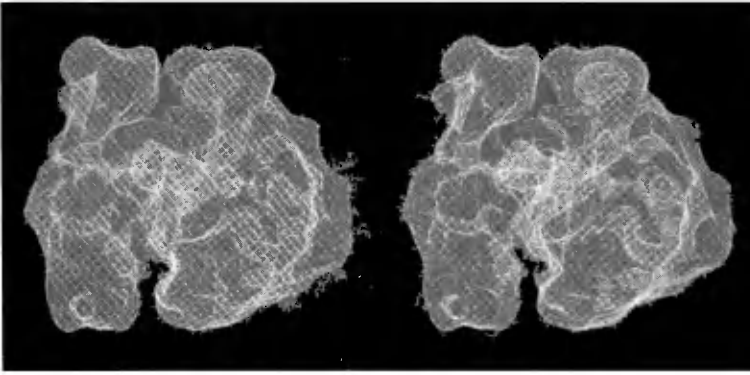


Рис. 5.9. Стереодиаграмма трехмерной карты электронной плотности 70S рибосомы *Escherichia coli* в неперекрывающейся (боковой) проекции со стороны L7/L12-стержня по данным криоэлектронной микроскопии.

Трехмерная реконструкция морфологии 70S рибосомы с разрешением 25 Å получена путем компьютерной обработки 4 300 индивидуальных изображений различных проекций неконтрастированных частиц в стеклообразном льде. Фотография предоставлена Дж. Франком.

Frank et al. (1995) *Nature* 376: 441–444

рибосом, состояло в том, что малая субъединица несколько изменяет свою конформацию при ассоциации с большой субъединицей. Так, боковая лопасть 30S субъединицы слегка отдалается от ее головки, становится более уплощенной (лопатообразной) и формирует хорошо выявляемую полость между ней и головкой. На новых моделях видны также дополнительные детали 30S субъединицы — небольшой «клюв» на головке, слегка выраженная раздвоенность дистального (по отношению к головке) конца тела и «носок», или «шпора», выступающая из дистального конца тела (рис. 5.9). Большая субъединица меньше изменяется при ассоциации в полную рибосому. Наиболее очевидное отличие от изолированной субъединицы состоит в том, что палочкообразный L7/L12-стержень располагается более перпендикулярно по отношению к поверхности раздела между субъединицами. Также следует обратить внимание, что субъединицы в полной рибосоме (по крайней мере, в «пустой», нетранслирующей) выглядят как бы слегка раздвинутыми (разомкнутыми), особенно со стороны палочкообразного стержня, оставляя таким образом свободным доступ снаружи к межсубъединичному пространству. Плотные контакты между субъединицами четко видны главным образом со стороны бокового L1-выступа большой субъединицы и боковой лопасти малой субъединицы. Контакт между головками двух субъединиц выглядит менее плотным, чем в случае высушенных контрастированных рибосом.

5.6. Структура рибосомы с атомным разрешением

Громадным достижением молекулярной биологии последующих лет было определение структуры прокариотических рибосомных частиц на уровне атомного разрешения — вплоть до 3—2,4 Å (0,3—0,24 нм) — с помощью рентгеноструктурного анализа их кристаллов (Стейц и др., 1998, 1999, 2000; Рамакришнан и др., 1999, 2000; Йонат и др., 2000, 2001; Ноллер и др., 1999, 2001). В целом эти кристаллографические исследования показали сходство рентгеновских карт электронной плотности с картами на основе электронно-микроскопических данных; во всяком случае все морфологические черты рибосом, выявленные с помощью электронной микроскопии, были подтверждены рентгеноструктурным анализом. В то же время многие важные морфологические детали рибосом были определены с гораздо большей точностью, не говоря о подробном изучении внутренней структуры рибосом, третичной структуры рибосомных РНК в составе рибосомы, расположения и структуры рибосомных белков и всей картины четвертичной структуры рибосомы. На рисунках в гл. 6 и 7 представлены структурные модели прокариотических рибосомных частиц — изолированных 30S и 50S субъединиц, полной 70S рибосомы и их РНК, построенные на основании этих рентгеноструктурных исследований.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 5

- Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Crassucci, R. A., Sweet, R., Frank, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (1998). A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* **93**: 1105—1115.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (1999). Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**: 841—847.

- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905–920.
- Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N., and Noller, H. F. (1999). X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* **285**: 2095–2104.
- Clemons, W. M., May, J. L. C., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S., and Ramakrishnan, V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* **400**: 833–840.
- Frank, J., Zhu, J., Penczek, P., Li, Y., Srivastava, S., Verschoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R., Lata, R. K., and Agrawal, R. K. (1995). A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the *E. coli* ribosome. *Nature* **376**: 441–444.
- Hall, C. E., and Slayter, H. S. (1959). Electron microscopy of ribonucleoprotein particles from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **1**: 329–332.
- Harms, J., Schlunzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**: 679–688.
- Huxley, H. E., and Zubay, G. (1960). Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **2**: 10–18.
- Kastner, B., Stoeffler-Meilicke, M., and Stoeffler, G. (1981). Arrangement of the subunits in the ribosome of *Escherichia coli*: Demonstration by immunoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6652–6656.
- Lake, J. A. (1976). Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes, *J. Mol. Biol.* **105**: 131–159.
- Nonomura, Y., Blobel, G., and Sabatini, D. (1971). Structure of liver ribosomes studied by negative staining. *J. Mol. Biol.* **60**: 303–324.
- Schlunzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluhmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., and Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**: 615–623.
- Stark, H., Mueller, F., Orlova, E. V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R., and van Heel, M. (1995). The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure* **3**: 815–821.
- Vasiliev, V. D. (1971). Electron microscopy study of 70S ribosomes of *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **14**: 203–205.
- Vasiliev, V. D. (1974). Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopy data. *Acta Biol. Med. Germ.* **33**: 779–793.
- Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., Baranov, V. I. and Spirin, A. S. (1983). Structural study of translating 70S ribosomes from *Escherichia coli*: I. Electron microscopy. *FEBS Letters* **155**: 167–172.
- Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., and Ryzantsev, S. N. (1983). Structure of the *Escherichia coli* 50S ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* **171**: 561–569.
- Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., Lutsch, G., Westermann, P., and Bielka, H. (1989). Structure of the rat liver ribosome 40S subunit: freeze-drying and high-resolution shadow casting. *FEBS Letters* **248**: 92–96.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327–339.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**: 883–896.

6.1. Введение

Рибосомные РНК (рРНК) составляют от 50 до 70 % массы рибосомных частиц. Именно они определяют размеры и форму рибосомных субъединиц. Молекулы рРНК формируют структурный каркас для специфического размещения рибосомных белков в рибосоме.

Рибосомная РНК играет также ведущую роль в функциях рибосомы, участвуя во всех событиях в процессе синтеза белка. Таким образом, можно сказать, что рибосома — это прежде всего ее РНК.

Необходимо отметить, что среди молекулярных биологов эта концепция не была общепринятой до начала 1980-х гг. В 1970-е гг., несмотря на растущее количество фактов, свидетельствующих об участии рРНК в организации функциональных центров рибосомы, было принято считать, что активные центры рибосомы образованы в основном рибосомными белками, тогда как рРНК служит только каркасом для специфического связывания белков. Смена парадигмы произошла после того, как выяснилось, что, с одной стороны, поддержание функций рибосомы прямо связано с высокой эволюционной консервативностью структуры РНК и, с другой стороны, рибонуклеиновые кислоты в принципе способны выполнять как функции специфического связывания лигандов, так и каталитические функции.

В настоящее время считается, что основную функциональную нагрузку в рибосомах, включая организацию мРНК- и тРНК-связывающих центров, каталитическую пептидилтрансферазную активность и динамические функции, несут именно рибосомные РНК, а рибосомные белки лишь помогают стабилизировать ее внутририбосомную структуру и в ряде случаев обеспечивают более тонкую регуляцию ее активностей.

Можно предполагать, что древняя — примитивная — рибосома могла состоять только из РНК.

6.2. Типы рибосомных РНК и их первичная структура

Подобно всем другим одноцепочечным полирибонуклеотидам, молекулы рРНК отвечают на изменения ионной силы и температуры изменением структуры от полностью развернутой к очень компактной. В то же время принято характеризовать и обозначать рРНК (как и рибосомные субъединицы), используя коэффициенты их седиментации, которые определяются размером и формой макромолекул. В связи с этим необходимо подчеркнуть, что значения коэффициентов седиментации, которые используются для обозначения различных типов рРНК, действительны только в ограниченном диапазоне условий — при ионной силе 0,1, температуре 20 °С и в присутствии Mg^{2+} или других двухвалентных катионов.

6.2.1. РНК малой рибосомной субъединицы

Малая субъединица рибосомы (30S или 40S) содержит одну молекулу высокомолекулярной рРНК, которая обозначается как 16S рРНК в случае бактериальных рибосом, и 16S-подобная рРНК в других случаях. Наиболее изученная 16S рРНК из рибосом *E. coli* состоит из 1542 нуклеотидных остатков. Подобная же длина — около 1500 нуклеотидов — характерна для 16S рРНК всех других эубактерий, включая микоплазму и цианобактерии, для 16S рРНК хлоропластов высших растений, а также для 16S рРНК архей (архебактерий). Наиболее короткая 16S-подобная рРНК, имеющая длину всего около 600 нуклеотидов, обнаружена в малой рибосомной субъединице митохондрий (кинетопласта) трипаносоматид (*Crithidia*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Trypanosoma*). Митохондриальные рибосомы млекопитающих также содержат относительно короткие 16S-подобные рРНК (10—12S рРНК) длиной около 950 нуклеотидов.

Цитоплазматические рибосомы всех эукариотических организмов — простейших, растений и животных — содержат наиболее длинные молекулы 16S-подобной рибосомной РНК (18S рРНК), длиной до 2000 нуклеотидов. Интересно, что митохондриальная 16S-подобная рРНК грибов и высших растений столь же длинная.

Почти все 16S и 16S-подобные рРНК представляют собой ковалентно непрерывные полинуклеотидные цепи. Однако в митохондриях некоторых видов простейших были обнаружены фрагментированные молекулы 16S рРНК, например митохондриальная 16S-подобная рРНК одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, которая состоит из четырех отдельных полирибонуклеотидов.

6.2.2. РНК большой рибосомной субъединицы

Большая рибосомная субъединица (50S или 60S) содержит высокомолекулярную рРНК, называемую 23S рРНК в случае бактерий и 23S-подобной рРНК в иных случаях, а также относительно низкомолекулярную рРНК, называемую 5S рРНК.

Бактериальная 23S рРНК, как и 16S рРНК, представляет собой непрерывную полинуклеотидную цепь. В то же время молекулы 23S-подобной рРНК из большой рибосомной субъединицы цитоплазматических рибосом всех эукариотических организмов состоят из двух прочно ассоциированных полинуклеотидных цепей: высокомолекулярной 28S рРНК с длиной 4700—4800 нуклеотидных остатков и относительно низкомолекулярной 5,8S рРНК, которая имеет длину около 160 нуклеотидных остатков и является структурным эквивалентом 5'-концевого 160-нуклеотидного сегмента 23S рРНК прокариот. Иначе говоря, 5'-конец 23S рРНК в процессе эволюции эукариот оказался «отщеплен» с образованием эукариотической 5,8S рРНК.

Другим примером прерывистости рРНК больших субъединиц может служить 23S-подобная рРНК рибосом хлоропластов растений. Она содержит 4,5S фрагмент (длиной около 110 нуклеотидов), который является структурным эквивалентом 3'-концевого сегмента 23S рРНК *E. coli*; фрагмент также прочно ассоциирован с высокомолекулярной рРНК. Цитоплазматические 23S-подобные рРНК некоторых простейших могут представлять собой пример гораздо более далеко

идущей фрагментированности. Так, 23S-подобная рРНК *Crithidia fasciculata* состоит из семи отдельных частей, а цитоплазматическая 23S-подобная рРНК *Euglena gracilis* — из 14 фрагментов.

Как и в случае рРНК из малой рибосомной субъединицы, длина полинуклеотидной цепи молекулы рРНК из большой субъединицы обнаруживает значительные вариации в зависимости от вида организма. Например, 23S рРНК из 50S субъединицы рибосомы *E. coli* состоит из 2904 нуклеотидных остатков, в то время как цитоплазматическая 28S рРНК человека имеет длину 5025 нуклеотидов. Интересно, что цитоплазматическая и митохондриальная 23S-подобная рРНК (26S рРНК) дрожжей имеют близкие размеры (3392 и 3273 нуклеотидных остатка, соответственно, в случае *Saccharomyces cerevisiae*). Наоборот, большие рибосомные субъединицы митохондриальных рибосом млекопитающих очень сильно отличаются от больших субъединиц цитоплазматических рибосом — они содержат относительно короткие 23S-подобные рРНК (1560—1590 нуклеотидных остатков).

Как упоминалось ранее, в дополнение к одной молекуле 23S рРНК или комплексу 28S рРНК • 5,8S рРНК большая рибосомная субъединица цитоплазматических рибосом всех прокариот и эукариот содержит одну молекулу 5S рРНК, которая имеет длину около 120 нуклеотидов. В отличие от больших рибосомных РНК длина полинуклеотидной цепи 5S рРНК в процессе эволюции рибосом высококонсервативна: она варьирует всего от 115 до 125 нуклеотидов. В отличие от 5,8S рРНК она не так тесно включена в структуру 23S-подобной рРНК, транскрибируется с отдельного гена и, таким образом, не может рассматриваться как отщепленный фрагмент высокополимерной рРНК. 5S рРНК обнаружена также в рибосомах хлоропластов, но, по-видимому, отсутствует в митохондриальных рибосомах млекопитающих.

6.2.3. Модифицированные нуклеозиды рибосомных РНК

В дополнение к стандартным нуклеотидным остаткам — G, A, U и C — высокомолекулярные рРНК содержат модифицированные нуклеозиды. Они представлены главным образом псевдоуридином (Ψ) и метилированными (как по основаниям, так и по 2'-ОН-группе рибозы) нуклеозидными остатками. Хотя некоторые модифицированные участки рРНК в эволюции являются в высшей степени консервативными (такие как m⁶A1518/m⁶A1519 и m⁷G527 в 16S-подобных рРНК, рис. 6.1), количество модифицированных остатков в рРНК существенно различается у разных организмов и значительно увеличивается при переходе от эубактерий к многоклеточным эукариотам. Например, рРНК *E. coli* имеет девять остатков Ψ на 70S рибосому (одна в 16S рРНК и восемь в 23S рРНК), в то время как рРНК позвоночных содержит около 95 остатков Ψ. Последняя содержит также около 100 2'-метилированных остатков рибозы и 10 метилированных оснований. Распределение модифицированных остатков в молекулах рРНК и их возможная роль в организации структуры рРНК обсуждаются далее. Необходимо отметить, что у *E. coli* было обнаружено несколько метилаз и псевдоуридилаз, специфичных по отношению к последовательностям нуклеотидов. В клетках эукариот малая ядрышковая РНК (snoРНК) участвует в модификациях рРНК, формируя комплементарные комплексы рРНК • snoРНК в модифицируемых участках.

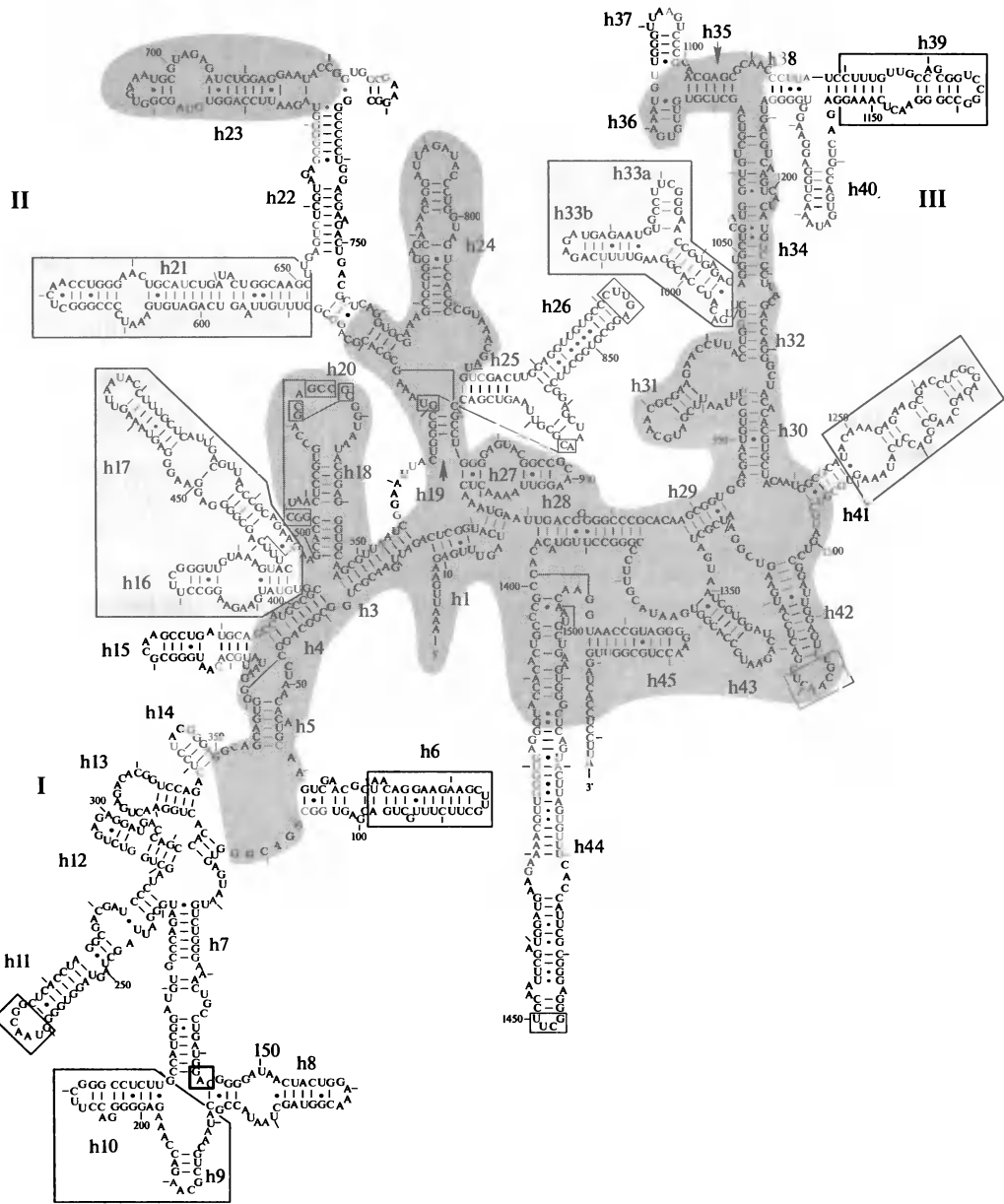


Рис. 6.1. Модель вторичной структуры 16S рРНК *Escherichia coli*.

Спиральные участки пронумерованы со строчной буквой h (helix), от h1 до h45, чтобы обозначить их принадлежность к малой рибосомной субъединице. Уотсон-криковское спаривание оснований представлено короткими линиями, неканоническое спаривание — точками; положения каждого десятого нуклеотида цепи указано короткими линиями снаружи структурных элементов, а каждый пятидесятый нуклеотид пронумерован. Некоторые дальние взаимодействия в третичной структуре отмечены длинными линиями. Эволюционно консервативные (универсальные) области структуры выделены серым фоном, а варибельные участки заключены в контуры.

Woese et al. (1980) *Nucleic Acids Res.* **8**: 2275—2293. Woese et al. (1983) *Microbiol. Rev.* **47**: 621—669. Gutell (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**: 3051—3054. Gerbi (1996) In *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing, and Function in Protein Biosynthesis* (Zimmermann and Dahlberg, eds.), pp. 71—87, CRC Press, Boca Raton

6.3. Вторичная структура рибосомных РНК

6.3.1. Основные принципы

Общие принципы вторичной структуры одноцепочечных высокополимерных РНК, включая рибосомные РНК, были сформулированы еще на рубеже 1950—1960-х гг. (Доти с сотр., 1959, 1960; Спирин с сотр., 1959; Спирин, 1960) и описаны в подразд. 1.4.

Как уже указывалось, на основании ряда экспериментальных данных было постулировано, что основным элементом вторичной структуры РНК являются короткие двойные спирали, образуемые за счет комплементарных взаимодействий смежных участков полирибонуклеотидной цепи (см. рис. 1.6). Допускалось также, что при компактном сворачивании цепи (см. подразд. 6.4) двуспиральные области в РНК могут быть образованы не только между соседними сегментами, но также и между достаточно удаленными друг от друга областями полирибонуклеотидной цепи.

Значительный шаг в исследовании вторичной структуры рРНК был сделан, когда стали известны несколько их реальных нуклеотидных последовательностей. Это позволило Вузу и Ноллеру с соавторами (1980, 1983) предложить и успешно использовать сравнительный анализ последовательностей структуры рРНК, основанный на очень простом постулате: функционально эквивалентные молекулы РНК должны формировать сравнимые трехмерные структуры, безотносительно к тому, насколько похожи или различны их нуклеотидные последовательности. Другими словами, если данный постулат верен, то рРНК различных организмов должна формировать изоморфные вторичные и третичные структуры. Это означает, что в гомологичных двуспиральных областях рРНК должны наблюдаться координированные компенсаторные изменения (например, $A:U \rightleftharpoons G:C$). Критической точкой сравнительного подхода является, таким образом, поиск позиционной ковариантности (коррелированных замен) в предполагаемых элементах вторичной структуры (двойных спиралях).

Таким путем были построены схематические модели вторичной структуры архебактериальных, эубактериальных, эукариотических, митохондриальных и хлоропластных рРНК и с использованием некоторых экспериментальных подходов доказаны места расположения многих двуспиральных участков и одноцепочечных областей.

Окончательным решением проблемы вторичной структуры рРНК, приведшим к детальному описанию ее наиболее характерных мотивов, стала прямая расшифровка структур отдельных блоков и фрагментов рРНК с помощью ЯМР-спектроскопии и целых рибосомных субъединиц рентгеноструктурным методом на атомном уровне (см. обзоры: Moore, P. V., 1999; Moore, P. V., and Steitz, T. A., 2003). Были полностью подтверждены как общий характер вторичных структур рРНК малой и большой субъединиц рибосом, так и основной принцип их формирования — антипараллельные комплементарные взаимодействия участков одной и той же полирибонуклеотидной цепи, в основном за счет канонического уотсон-криковского спаривания ($G:C$ и $A:U$), с образованием многочисленных двойных спиралей.

Было доказано, что двойные спирали в рРНК, как и в тРНК, имеют конформацию, очень близкую к классической А-форме (см. подразд. 1.4).

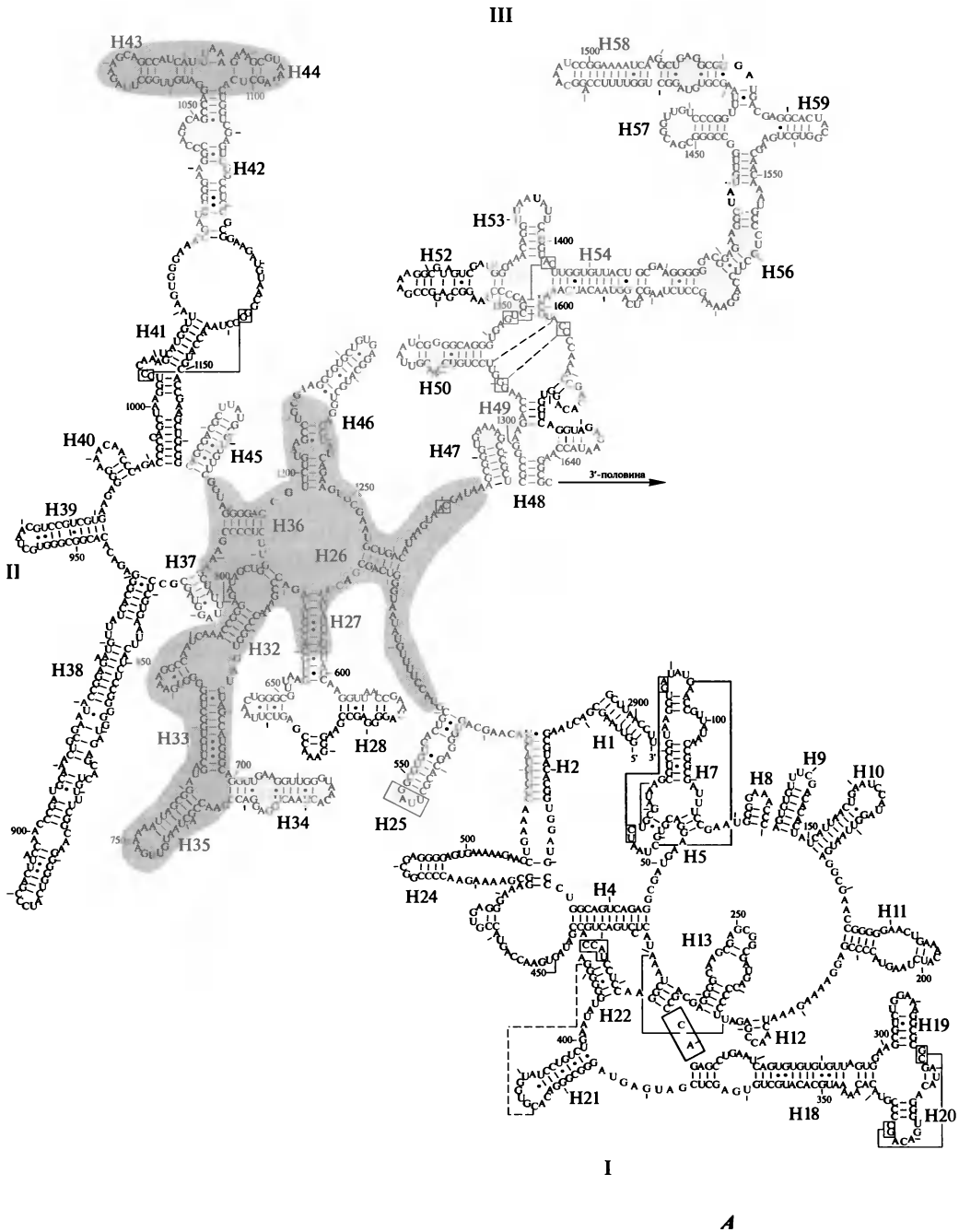


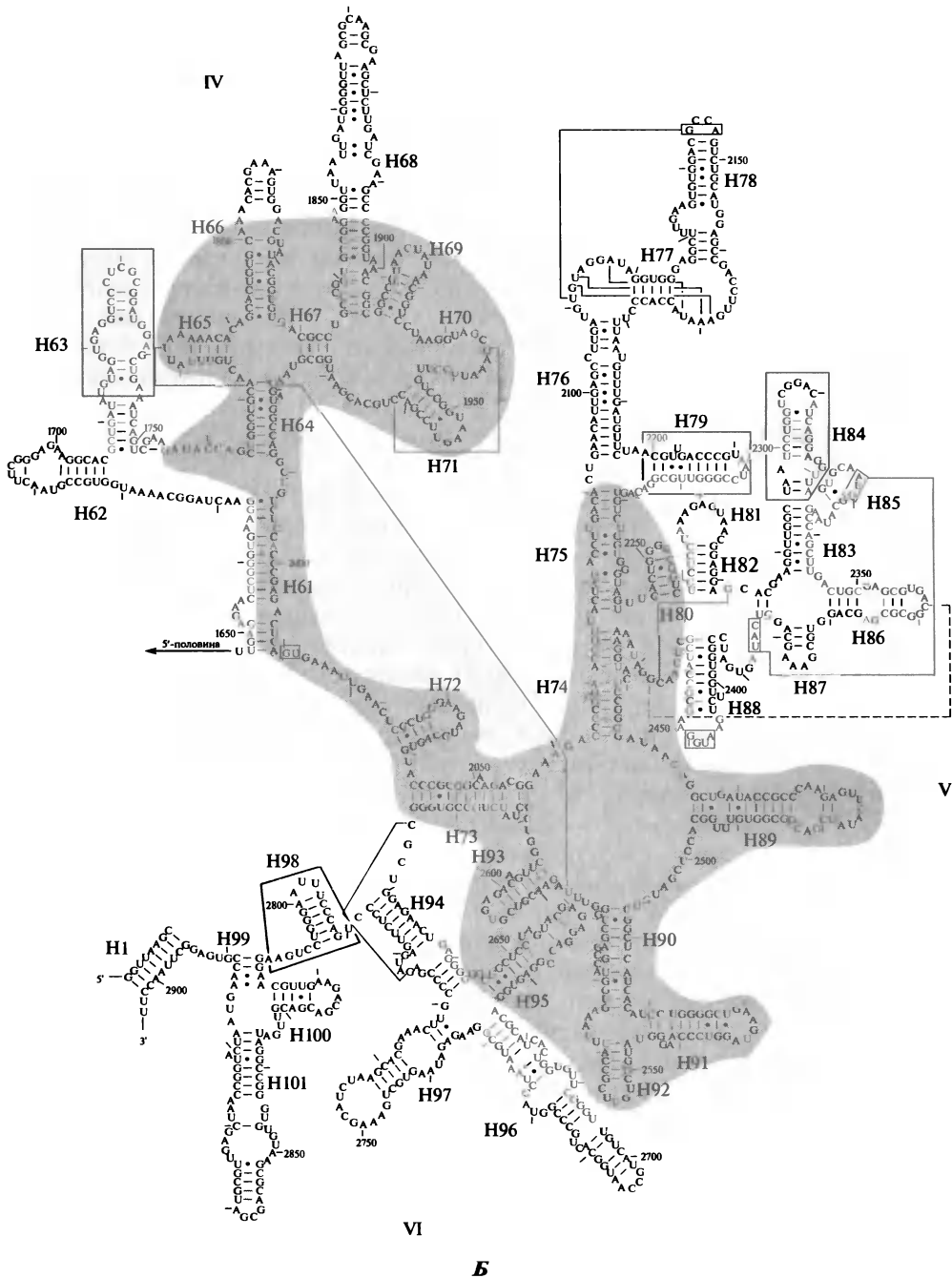
Рис. 6.2. Модель вторичной

A: 5'-половина

B: 3'-половина

Все обозначения такие же, как и на рис. 6.1, но спирали пронумерованы к большой рибосомной

Branlant et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9: 4303—4324. Noller et al. (1981)



структуры 23S рРНК *Escherichia coli*.

молекулы, домены I, II и III.

молекулы, домены IV, V и VI.

с прописной буквой Н (Helix), от Н1 до Н101, чтобы обозначить их принадлежность субъединице.

Nucleic Acids Res. **9**: 6167—6189. Gutell et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**: 3055—3074

6.3.2.1. Двуспиральные участки ближнего порядка («шпилечные» спирали)

Основные черты организации вторичной структуры рРНК малой и большой субъединиц одинаковы. На схемах вторичной структуры 16S и 23S рРНК *E. coli* (рис. 6.1 и 6.2) видно, что цепи обеих высокополимерных рибосомных РНК сворачиваются, образуя большой набор двуспиральных участков. Хотя двуспиральные участки рРНК характеризуются значительным преобладанием канонических уотсон-криковских пар G:C и A:U, в них часто присутствуют и неканонические пары. Самая распространенная среди них — G:U (U:G), наиболее близкая по своим геометрическим параметрам к каноническим парам (около 13% всех пар в рРНК *E. coli*). Среди других возможных неканонических спариваний оснований достаточно часто наблюдаются A:G (G:A) и U:U (3 и 1% соответственно). Относительная частота уотсон-криковских и не уотсон-криковских пар оснований в 16S и 23S рРНК одинакова.

Двуспиральные участки, образующиеся в 16S и 23S рРНК (см. рис. 6.1 и 6.2), а также в 5S рРНК (рис. 6.3), могут быть классифицированы следующим образом: 1) совершенные шпильки — двойные спирали с концевыми (торцевыми) петлями, без боковых выступов и петель (например, шпильки h14, h26, h43, h45 на рис. 6.1 — здесь и ниже все примеры взяты из модели вторичной структуры 16S рРНК *E. coli*), большая часть из которых, однако, характеризуется присутствием неканонических пар оснований; 2) двуспиральные шпильки с петлями (выступами) на одной из сторон спирали, состоящими из одного или двух нуклеотидов — как правило, пуриновых (например, шпильки h6, h10, h11, h39 на рис. 6.1); 3) двойные спирали с трехнуклеотидными «выпетливаниями» (например, шпильки h12, h24, спираль h34), которые, как было указано в подразд. 1.4 (см. рис. 1.12), приводят к резкому излому спирали; 4) двойные спирали с большими боковыми петлями и двуспиральными ответвлениями (такие, как район спирали h7 со шпильками h8, h9 и h10 или группа спиралей h30-h32-h34-h35-h38 со шпильками h31, h33, h36, h37, h39 и h40); 5) так называемые составные шпильки или спирали с внутренними петлями, где области двойных спиралей чередуются с некомплементарными областями (например, шпилька h41). Таким образом, в рРНК двойные спирали, образованные за счет взаимодействия смежных участков цепи, — так называемые «шпильки» — в большинстве случаев не идеальны, а в той или иной степени искажены — наличием неканонических пар, вставками неспаренных последовательностей в одной из цепей шпильки (так называемыми боковыми «выпетливаниями» нуклеотидов), протяженными зонами неспаренных участков, прерывающими спираль, разветвлениями спирали и т. п. Что касается так называемых «неспаренных зон», прерывающих спиральные участки, то ЯМР-анализ локальных структур и рентгеноструктурный анализ полных структур рРНК показали, что они представляют собой вовсе не гибкие неупорядоченные цепи, а чаще всего достаточно сложные и хорошо упорядоченные специфические структуры типа «дефектных», сильно искаженных и искривленных двойных спиралей с неканоническими взаимодействиями между нуклеотидными остатками. В частности, большая «составная» шпилька h44 16S рРНК, в нескольких местах прерывающаяся некомплементарными участками цепи на схеме вторичной структуры 16S рРНК (см. рис. 6.1), на самом деле представляет собой единую двойную спираль и является самой длинной шпилечной

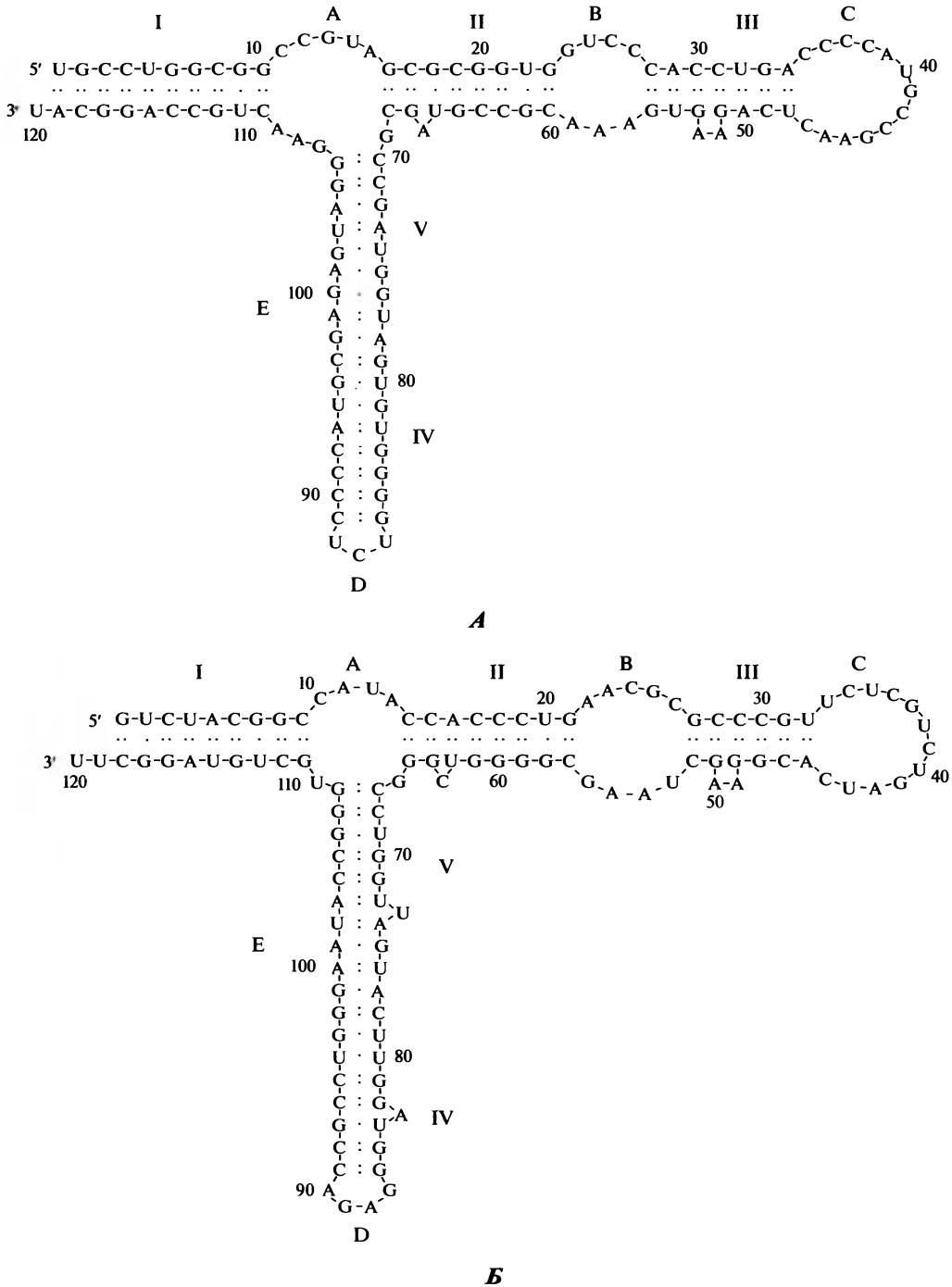


Рис. 6.3. Модель вторичной структуры 5S рибосомной РНК.

А: 5S РНК *Escherichia coli*.

Б: 5S РНК человека.

спиралью, простирающейся на поверхности малой рибосомной субъединицы вдоль всего ее тела (см. ниже).

6.3.2.2. Торцевые петли

Торцевые петли двуспиральных шпилек рРНК представляют особый интерес, так как они обычно формируют трехмерные структуры нескольких хорошо очерченных типов или участвуют в их формировании (см. подразд. 1.4, рис. 1.13 и 1.14). Наиболее распространенный тип — так называемые тетрапетли (tetraloops). Например, структура тетрануклеотидной петли (тетрапетли) класса UNCG (где N — любой нуклеотидный остаток), замыкающейся парой C:G (она представлена в 16S рРНК *E. coli* в шпильках h16, h33a и h44), характеризуется неканонической парой G:U, продолжающей двойную спираль шпильки, а цитозин цитидилового остатка «накрывает» урацил спирали, вступая с ним в стэкинг-взаимодействие; предшествующий же нуклеотид оказывается на верхушке структуры и «накрывает» цитидиловый остаток, тоже вступая с ним в стэкинг (ср. с аналогичной тетрапетлей на рис. 1.13). Резкий поворот полинуклеотидной цепи в районе фосфодиэфирного мостика между U и N стабилизируется, кроме указанных стэкинг-взаимодействий, также и водородной связью между аминок группой цитозина и кислородом фосфатной группы этого мостика.

Другой пример упорядоченной трехмерной структуры торцевой петли в рРНК — конформация тетрапетель класса GNRA (где N — любой нуклеотид, а R — пуриновый нуклеотид) — одного из наиболее распространенных классов тетрапетель в рРНК (см. шпильки h8, h9, h12, h15, h27, h33b, h36, h41, h45 на рис. 6.1). В такой «петле» пара оснований G:A продолжает двойную спираль, пуриновый нуклеотид (R) ложится на эту пару, вступая с ней в стэкинг-взаимодействие, а предшествующий нуклеотид (N) оказывается на самой верхушке в стэкинге с пуриновым (R) (ср. с рис. 1.13). Здесь поворот полинуклеотидной цепи стабилизируется водородной связью между основанием G и фосфатом RpA и водородной связью между основанием R (A или G) и 2'-ОН-группой гуанозина. В этой структуре может быть идентифицирован мотив «U-поворота», характерный для структуры антикодоновой петли РНК (см. подразд. 3.2.2. и рис. 3.5). Основание нуклеотида N (C, A, U или G), находящееся на вершине, не вовлечено в водородные связи с другими основаниями петли и, таким образом, готово для спаривания с основаниями неспаренных участков при формировании третичной структуры.

6.3.2.3. Псевдоузлы

Когда полинуклеотидная цепь торцевой петли двуспирального участка комплементарно спаривается с одנותяжевым участком цепи, предшествующим спиральному участку или следующим за ним, возникает структура, называемая псевдоузлом (см. рис. 1.14). Как правило, короткая двойная спираль, образуемая торцевой петлей и одנותяжевым участком, слипается своим гидрофобным торцом с гидрофобным торцом основной двойной спирали, образуя единую двойную спираль (коаксиальный стэкинг). Такие псевдоузлы представляют собой довольно стабильные структуры и встречаются не только в рРНК, но и в специальных районах мРНК (см. далее). Образование псевдоузлов может происходить также и при комплементарном взаимодействии боковой петли двуспирального участка с пред-

шествующим или последующим однотяжевым участком. В третичной структуре рРНК (см. далее) важную роль могут играть псевдоузлы, образуемые торцевыми петлями с дальними однотяжевыми участками. Во вторичной структуре 16S рРНК имеются три эволюционно консервативные псевдоузелковые двойные спирали, показанные на рис. 6.1: это спирали 17—19/916—918, 505—507/524—526 и 570—571/865—866. По-видимому, они играют важную роль в организации функциональных центров рибосомы.

6.3.2.4. Однотяжевые спирали

Известно, что цепь полиадениловой кислоты — поли(А) — в растворе при нейтральных рН и физиологических температурах в присутствии солей не является беспорядочным полирибонуклеотидом, а имеет тенденцию образовывать регулярную однотяжевую спираль, стабилизированную взаимным стэкингом пуриновых оснований. Параметры спирали с 9 остатками на виток близки к параметрам А-формы нуклеиновых кислот (см. Зенгер, 1987). Однотяжевые спирали такого типа могут возникать в РНК при наличии в однотяжевом участке большой доли пуриновых нуклеотидных остатков. Такие однотяжевые спирали могут продолжать одну из цепей двуспирального участка, как в 3'-концевой последовательности АССА, а также в пятинуклеотидной 3'-проксимальной последовательности антикодоновой петли тРНК (см. рис. 3.7) (в последнем случае однотяжевая спираль сильно стабилизирована водородными связями с двумя нуклеотидными остатками 5'-проксимальной части антикодоновой петли).

6.4. Конформационная подвижность и компактное сворачивание рибосомных РНК

6.4.1. Конформационная подвижность изолированных рибосомных РНК

В начале 1960-х гг. было установлено, что изолированные рРНК в более или менее физиологических условиях — в растворах умеренной ионной силы (порядка 0,1), при нейтральных рН и температурах в районе +20—+40 °С — образуют множественные двуспиральные участки за счет комплементарного спаривания в основном смежных участков цепи, т. е. формируют развитую вторичную структуру, а присутствие достаточного количества ионов Mg^{2+} приводит к дальнейшей компактизации молекул РНК. В этих ранних исследованиях не только был установлен сам факт способности высокополимерных РНК сворачиваться в компактные структуры, но и продемонстрирована присущая РНК конформационная подвижность в зависимости от условий (Спирин, 1960, 1963, 1964; Киселев и др., 1961). Удалось показать способность высокополимерных рРНК, включая РНК, к изменениям своей конформации в самых широких пределах, от состояния полностью развернутой полирибонуклеотидной цепи без вторичной и третичной структур при обессоливании раствора или при повышенных температурах через промежуточные конформации с более или менее сформированной вторичной структурой до компактных молекул с развитой третичной структурой в условиях достаточной ионной силы раствора и необходимого количества связанного с молекулами Mg^{2+} (см. рис. 1.15). Впоследствии выяснилось, что кон-

формационная подвижность, принципиально присущая РНК, проявляется и в различных локальных изменениях ее структуры как в зависимости от физико-химических условий среды, так и при присоединении белков и других лигандов, а также в процессе выполнения ею различных функций. Общая и локальная конформационная подвижность рРНК играет важнейшую роль в функционировании рибосомы.

6.4.2. Специфическое сворачивание изолированных рибосомных РНК в компактные рибосомоподобные структуры

Многочисленные исследования с применением разнообразных химических, энзиматических и физических подходов позволили сделать заключение, что рибосомные РНК в растворе образуют вторичную структуру, очень похожую на ту, которую они имеют в составе рибосомных частиц, хотя и были обнаружены некоторые локальные изменения в конформации областей рРНК, вовлеченных во взаимодействие с рибосомными белками. Что касается дальнейшего сворачивания рРНК при формировании третичной структуры, то при концентрациях Mg^{2+} и одновалентных катионов, оптимальных для функции рибосомы *in vitro* (около 5 мМ $MgCl_2$ при 100 мМ NH_4Cl или KCl), изолированные молекулы рРНК оказались несколько менее компактны, чем в рибосоме. Это можно было предсказать, поскольку значительное количество основных рибосомных белков, взаимодействующих с рРНК в рибосоме, должно вносить существенный вклад в суммарный заряд РНК. Вместе с тем оказалось, что можно подобрать такие условия в растворе, которые достаточны для поддержания компактно свернутого состояния изолированной рРНК и без рибосомных белков (Васильев и др., 1978; Васильев и Залите, 1980; Васильев, Спириин и др., 1986). Эти условия включают относительно высокую концентрацию Mg^{2+} (около 20 мМ), увеличенную ионную силу (0,3—0,5), иногда присутствие ди- и полиаминов и этанола. Следует заметить, что те же условия являются оптимальными для реконструкции рибосомных частиц из рРНК и рибосомного белка *in vitro* (см. подразд. 7.6.2). В данных условиях изолированная рРНК приобретает компактную конформацию, близкую к таковой в составе рибосомы. Электронно-микроскопические исследования изолированных рРНК в компактном состоянии позволили впервые экспериментально продемонстрировать их способность к самосворачиванию (самоорганизации) в специфические структуры: каждый вид высокополимерной рРНК — 16S и 23S рРНК — сворачивался в частицы, имеющие характерную форму и размеры, близкие к форме и размерам соответствующих им рибосомных субъединиц — 30S и 50S (рис. 6.4). Так, молекулы 16S рРНК в компактной конформации имели специфическую Y- или V-подобную форму, хорошо вписывающуюся в контуры 30S субъединицы (рис. 6.4, А). Электронно-микроскопические изображения молекул 23S рРНК в компактной конформации принципиально отличались от таковых 16S рРНК и были очень похожи на изображения исходной 50S субъединицы: они демонстрировали полусферическую форму частиц с тремя характерными выступами с одной стороны, лишь несколько редуцированными по сравнению с выступами 50S субъединицы (рис. 6.4, Б).

Таким образом, было показано, что рРНК способна к специфической самозакладке в компактные частицы с уникальной формой. Сходство специфической

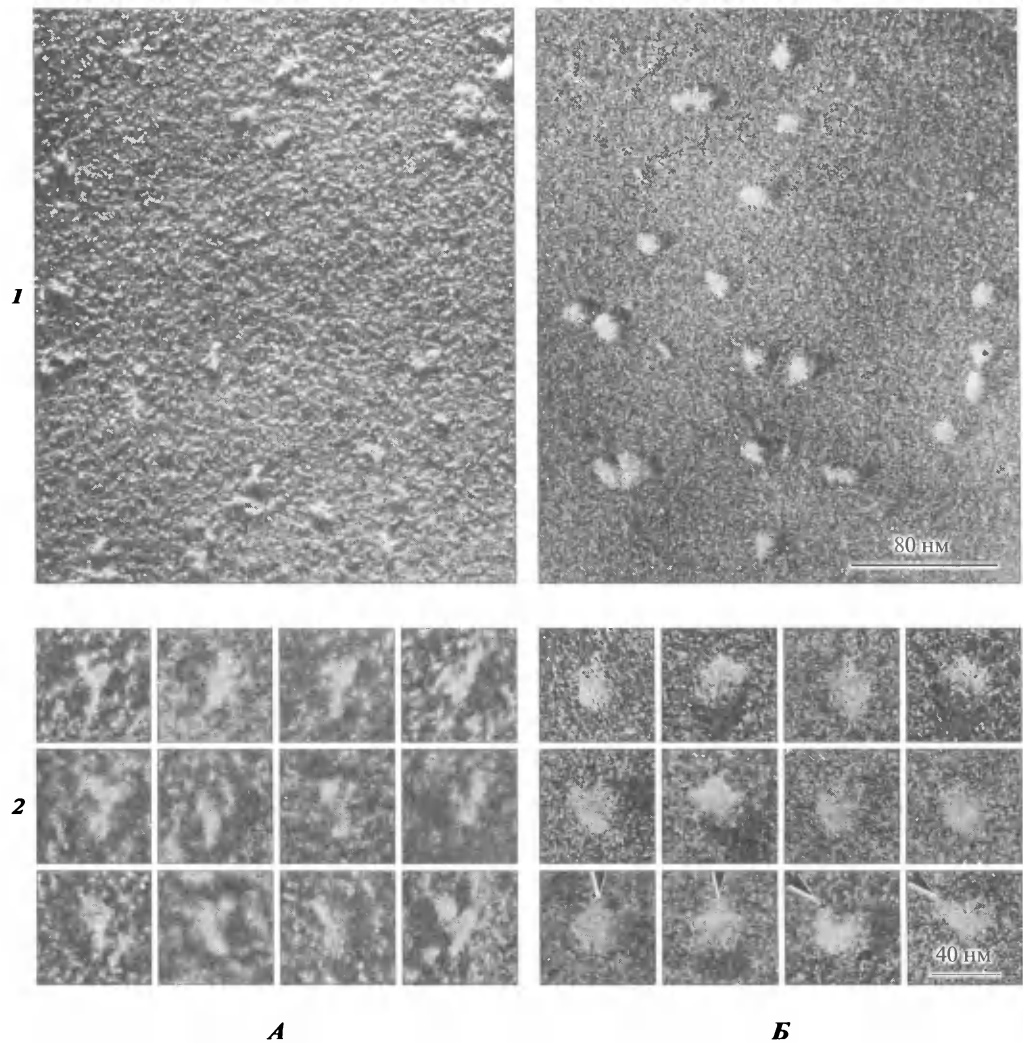


Рис. 6.4. Электронные микрофотографии изолированных рибосомных РНК *Escherichia coli* в компактных конформациях.

1: общий вид («поле изображений»).

2: галереи изображений.

А: Y-подобные частицы 16S рРНК. Vasiliev et al. (1978) *FEBS Lett.* **95**: 273—276.

Б: полусферические частицы 23S РНК с тремя редуцированными выступами. Vasiliev and Zalite (1980) *FEBS Lett.* **121**: 101—104.




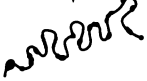
Образцы для электронной микроскопии были высушены из замороженного состояния и оттенены металлом.

Фотографии предоставлены В.Д. Васильевым

формы рРНК в изолированном состоянии и в рибосомных частицах позволяет сделать заключение, что специфическая самоукладка рРНК в основном определяет третичную структуру рРНК и рибосомы. Из сходства формы рРНК и соответствующей рибосомной субъединицы следует, что именно компактное самосворачивание РНК определяет формирование основных морфологических особенностей рибосомных частиц.

6.4.3. Разворачивание компактных рибосомных частиц

Специфическая компактная структура рРНК в составе рибосомных частиц в определенных физических условиях может быть нарушена. Было показано, что в ответ на удаление Mg^{2+} из рибосомных частиц они ведут себя как типичные полиэлектролиты, подобно изолированной рРНК, и их размеры увеличиваются из-за возрастающего электростатического отталкивания между отрицательно заряженными фосфатными группами рРНК в составе рибосомных частиц (рис. 6.5; см. Спири́н и др., 1963, 1966). Другими словами, компактные рибосомные частицы разворачиваются. При этом рибосомные белки остаются связанными с рРНК. В то же время присутствие белков определенно влияет на процесс разворачивания. В частности, в отличие от разворачивания изолированной рРНК разворачивание рибосомных частиц представляет собой процесс последовательных кооперативных переходов через дискретные промежуточные состояния, отражающие разные стадии разрыхления РНК. Так, после удаления основного прочно связанного Mg^{2+} уменьшение ионной силы вызывает резкую трансформацию 30S и 50S субъединиц в менее компактные 26S и 35S частицы соответственно. Следующая стадия — появление еще более разрыхленных 15S и 22S частиц. Считают, что эти дискретные стадии в разворачивании рибосомы отражают разрушение междоменных взаимодействий и, возможно, определенного типа третичных РНК-РНК-взаимодействий, стабилизируемых рибосомными белками. Указанные стадии не сопровождаются значительным плавлением вторичной структуры рРНК. Дальнейшее разворачивание рибосомных частиц при снижении ионной силы среды происходит более постепенно; переход от 15S и 22S частиц к практически развернутым 5S РНП-частицам при удалении противоионов отражает преимущественно последовательное независимое плавление многочисленных спиралей рРНК.

Морфология (контуры)	Коэффициент седиментации (ед. Сведберга) и обозначение частицы	Молекулярная масса, Да	Содержание белка, %	Плавающая плотность в $CsCl_3$, г/см ³
	50S	$1,5 \cdot 10^6$	33	1,65
	35S	$1,5 \cdot 10^6$	33	1,65
	22S	$1,4 \cdot 10^6$	33	1,65
	≈ 5S	$1,4 \cdot 10^6$	33	1,65

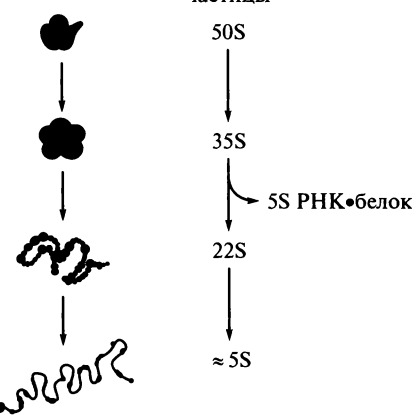


Рис. 6.5. Схема процесса ступенчатого разворачивания компактных рибосомных частиц (50S субъединиц) при удалении Mg^{2+} и уменьшении ионной силы раствора.

Спири́н и др. (1963) *Биохимия* **28**: 920—930. Gavrilova et al. (1966) *J. Mol. Biol.* **16**: 473—489. Gesteland (1966) *J. Mol. Biol.* **18**: 356—371

Как и в случае разворачивания изолированных рибосомных РНК, структурные переходы рибосомных частиц в зависимости от физико-химических условий среды отражают принципиальную способность частиц к перестройкам и подвижность их структурных блоков. Локальные перестройки (структурные «переключения» — «*switches*») и пространственные подвижки отдельных частей РНК представляют собой неотъемлемую часть поведения рибосом в процессах их функционирования. Значение некоторых структурных переходов между альтернативными локальными конформациями рРНК для функциональных переключений во время цикла элонгации и для динамического характера работы рибосомы рассмотрено далее.

6.5. Третичная структура рибосомных РНК

6.5.1. 16S рибосомная РНК

6.5.1.1. Дальние комплементарные взаимодействия и подразделение на домены

На общей схеме вторичной структуры 16S рРНК (см. рис. 6.1) видно, что помимо двойных спиралей шпильчатого типа и районов разветвленных двойных спиралей имеются комплементарные взаимодействия между дальними участками полинуклеотидной цепи, приводящие к образованию так называемых черешковых спиралей h3, h19 и h28. Каждая из перечисленных спиралей замыкает определенную область молекулы РНК так, что 3'- и 5'-концевые последовательности полинуклеотидной цепи данной области оказываются спарены и тем самым формируют черешок, из которого «растет», в виде его торцевой петли, вся эта область, со своей вторичной структурой. Таким образом, вышеназванные дальние комплементарные взаимодействия определяют подразделение всей молекулы РНК на области, называемые доменами, т. е. доменную структуру РНК.

Принято разделять всю совокупную вторичную структуру 16S рРНК на четыре части: три основных домена, а именно 5'-концевой домен, срединный домен и 3'-основной домен, а также две 3'-проксимальные спиральные шпильки (h44 и h45), иногда называемые 3'-концевым минорным доменом. Как уже говорилось, основные домены характеризуются наличием черешковых двойных спиралей, где спарены 5'- и 3'-концы домена. В 16S рРНК эти домены ведут себя как относительно автономные структурные единицы. Последовательность 912—920 и спираль 17—19/916—918 связывают три основных домена.

На рис. 6.1 серым фоном выделен район вышеуказанных дальних взаимодействий — черешков доменов и междоменных спиралей, а также примыкающих к ним участков вторичной структуры. Этот район оказался универсальным для 16S и 16S-подобных рРНК самого разного происхождения и, таким образом, может рассматриваться как эволюционно наиболее консервативное ядро рРНК малых рибосомных субъединиц. В то же время это универсальное ядро содержит главные структурные и функциональные части молекул 16S и 16S-подобных рРНК. Интересно, что большая часть модифицированных нуклеотидных остатков также группируются в универсальном ядре. Возможно, что это ядро — самая древняя часть рибосомы, и малая субъединица первозданной примитивной рибосомы представляла собой именно такое ядро РНК.

Сравнительный анализ вторичной структуры различных 16S и 16S-подобных рРНК выявил области, вариабельные по размерам, которые дополняют универ-

сальное ядро (см. рис. 6.1, незатененные области). Они эволюционно не столь консервативны и были названы «вариабельными» или «дивергирующими» областями. Там, где во вторичной структуре 16S рРНК *E. coli* находятся вариабельные области, в рРНК других организмов могут быть как существенно бóльшие по размеру (например, в случае цитоплазматических рибосом эукариот), так и меньшие участки полинуклеотидной цепи (например, в митохондриальной рРНК млекопитающих и трипаносоматид). Роль вариабельных областей в структуре и функции рибосомы, очевидно, не столь критична, как у ядра рибосомной РНК; во всяком случае в них пока не найдено функционально значимых мутаций. В молекулах, где полинуклеотидная цепь 16S-подобной рРНК прерывиста (например, в митохондриальной рРНК *Chlamydomonas*; см. подразд. 6.2.1), разрывы цепи присутствуют только в вариабельных областях.

6.5.1.2. Коаксиальный стэкинг спиралей

Компактность РНК определяется не только дальними комплементарными взаимодействиями между неспаренными участками полинуклеотидной цепи, но и компактной укладкой двойных спиралей внутри доменов. Давно известный тип межспиральных взаимодействий — *коаксиальный стэкинг спиралей*, впервые обнаруженный в третичной структуре тРНК (см. рис. 3.6). Такие взаимодействия часто встречаются и в рРНК, результатом чего является формирование единой двуспиральной структуры из двух или более коротких спиралей, как правило, соседствующих друг с другом. Так, в 5'-концевом домене соседние спирали h4 и h15, h7 и h10, h16 и h17 (последняя пара образует составную спираль длиной 12 нм) и другие оказываются состыкованными своими торцами. Соседние спирали h21, h22 и h23 находятся в коаксиальном стэкинге, формируя одну длинную изогнутую спираль в центральном домене 16S рРНК. Спирали h33 и h34 в 3'-проксимальном домене также состыкованы своими торцами. В том же домене спирали h36, h35, h38 и h39 по тому же принципу вместе образуют единую прямую спираль. Однако коаксиальный стэкинг может возникать и между удаленными спиральями, что, в частности, наблюдается при образовании эволюционно консервативных псевдоузлов, показанных на рис. 6.1 (спирали 17 — 19/916 — 918 и 570 — 571/865 — 866). В целом из всех указанных на рис. 6.1 двойных спиралей 23 спирали являются нестэкинговыми, а остальные формируют 13 групп коаксиально стэкинговыми спиралей.

6.5.1.3. Боковые спираль-спиральные взаимодействия

Другая группа взаимодействий между спиральями рРНК, определяющих компактное складывание молекулы в специфическую третичную структуру, — это взаимодействия спиралей бок о бок. Эти взаимодействия, как и можно было предполагать на основании особенностей структуры А-формы двойных спиралей, происходят путем контактов поверхностей их малых, или мелких, желобков. Наиболее распространенный тип боковых взаимодействий спиралей — «вторжение» аденозинов одной спирали в малый (минорный) желобок другой, и наоборот (А-*минорный мотив*, см. рис. 1.18). Эти аденозины образуют водородные связи как с 2'-гидроксилами рибозных остатков, так и с доступными группами азотистых оснований малого желобка рядом расположенной спирали (например, взаимо-

действии спиралей h6 и h8). Таким образом, несколько взаимно внедренных аденозинов обеспечивают плотное и стабильное слипание двух спиралей своими боковыми поверхностями.

Другой, несколько менее распространенный тип бокового взаимодействия двойных спиралей осуществляется путем внедрения рибозофосфатного остова одной спирали в малый желобок другой, как в случае слипания спиралей h7 и h21. Это взаимодействие стабилизируется водородными связями между кислородами фосфатных групп и 2'-гидроксилами рибоз, а также NH₂-группами гуанина. Во взаимодействии рибозофосфатных остовов спиралей большую роль играют и так называемые «рибозные застезки» (см. рис. 1.16). В этом случае две спирали укладываются бок о бок и контактируют друг с другом малыми (мелкими) желобками с образованием водородных связей между антипараллельными цепями спиралей — главным образом между атомами кислорода 2'-гидроксилов их рибозных остатков, а также между этими атомами кислорода и акцепторными группами (O или N) азотистых оснований.

Еще один тип взаимодействий между сахарофосфатными остовами полинуклеотидных цепей спиральных участков — образование Mg²⁺-мостиков между фосфатными группами. Наиболее прочные мостики, играющие существенную роль в третичной структуре РНК, возникают при участии двух или более ионов магния — так называемых Mg²⁺-кластеров (см. рис. 1.17). Наличие прочно связанного Mg²⁺ и таких мостиков в третичной структуре рРНК, доказанное с помощью рентгеноструктурного анализа высокого разрешения (см. подразд. 6.5.2), свидетельствует о том, что Mg²⁺ вносит более существенный вклад в структуру и компактизацию РНК, чем просто экранирование фосфатов и препятствование их электростатическому отталкиванию.

6.5.1.4. Перпендикулярные спираль-петлевые взаимодействия

Весьма существенный вклад в третичную структуру и компактизацию доменов 16S рРНК вносят относительно стабильные взаимодействия торцевых петель шпильки — в первую очередь тетрапетель — с определенными группами малого желобка двойных спиралей. Дело в том, что тетрапетли — очень распространенный мотив вторичной структуры рРНК; в 16S рРНК *E. coli* насчитывается 17 тетрапетель. Самый распространенный тип — петли GNRA (10 из 17), а второй по распространенности — петли UNCG (где N — любой нуклеотид, R — пуриновый нуклеотид). Азотистые основания вершущих тетрапетель не задействованы в уотсон-криковских взаимодействиях и готовы взаимодействовать с основаниями других структур. Идеальные для взаимодействия комбинации оснований встречаются в малых желобках спиралей; такие комбинации называют «рецепторами тетрапетель». Например, петля GCAA (GNRA-тип) шпильки h27 внедряется в малый желобок двуспиральной стыковки спиралей h1 и h28 с образованием водородных связей между неспаренными основаниями петли, обращенными в малый желобок группами азотистых оснований, и 2'-гидроксилами рибоз.

6.5.1.5. Общий вид третичной структуры

На рис. 6.6 изображена модель третичной структуры 16S рРНК, полученная в результате рентгеноструктурного анализа кристаллов рибосомных 30S субъединиц

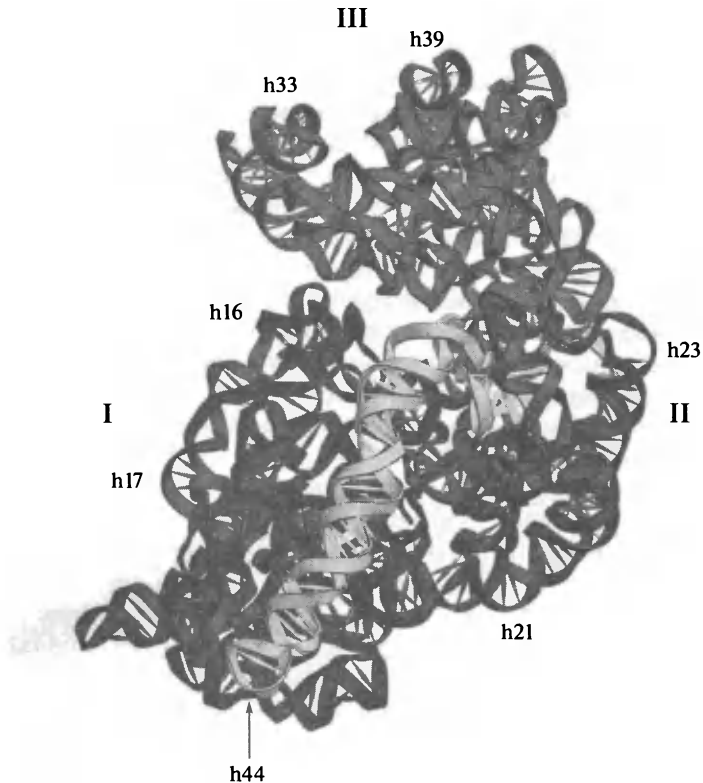


Рис. 6.6. Модель третичной структуры 16S рибосомной РНК эубактерии *Thermus thermophilus* по данным рентгеноструктурного анализа 30S рибосомной субъединицы с разрешением 3 Å. PDB ID 1FJf. Wimberly et al. (2000) *Nature* **407**: 327–339

грамотрицательной эубактерии *Thermus thermophilus* с разрешением 3 Å (Рамакришнан и др., 2000). Три основных домена РНК в их компактно свернутой форме и длинная спираль h44 дополнительного (минорного) домена хорошо видны на этой модели, будучи представлены разными цветами (см. рис. 6.1, А цв. вкл.). Сравнение с изображением и морфологической моделью рибосомной 30S субъединицы (см. рис. 5.5 и 5.6, А) показывает, что 5'-концевой домен (синий цвет) образует тело частицы, срединный домен (малиновый цвет) — боковую лопасть, 3'-проксимальный домен (красный цвет) — головку частицы. Желтым цветом представлен 3'-концевой спиральный домен (спирали h44 и h45), его шпилька h44 тянется от головки через все тело к его «хвосту». Три глобулярных домена 16S рРНК исходят из центрального района молекулы в области «шеи», так что действительно проекции молекулы имеют Y-образные очертания, как и было продемонстрировано электронно-микроскопическими наблюдениями изолированных 16S рРНК за 20 лет до рентгеноструктурных исследований (см. рис. 6.4, А). Точно так же рентгеноструктурные исследования полностью подтвердили прежний вывод, что форма рибосомной 30S субъединицы определяется в основном ее РНК, и ни одна из морфологически видимых частей не является чисто белковой.

Важнейшая особенность третичной структуры 16S рРНК состоит в том, что три ее основных компактных домена — I (соответствует телу), II (формирует боковую лопасть) и III (является ядром головки, см. рис. 6.6) — структурно мало

зависимы друг от друга и не обнаруживают каких-либо обширных нековалентных взаимодействий друг с другом. Каждый из этих компактных доменов может быть получен в индивидуальном виде путем междоменных разрезов цепи 16S рРНК и каждый изолированный домен может присоединять соответствующие ему рибосомные белки *in vitro* независимо от других доменов (см. подразд. 7.6.2). Структурная независимость доменов 16S рРНК сопровождается их взаимной подвижностью, которая играет ключевую роль в осуществлении молекулярно-механических функций рибосомы в процессе белкового синтеза (см. гл. 18).

6.5.2. 23S рибосомная РНК

6.5.2.1. Общий черешок и структурные домены

Основные различия в общем характере укладки между двумя классами молекул высокополимерных рРНК состоят в следующем. Во-первых, 3'- и 5'-концевые последовательности 23S и 23S-подобных рРНК, в отличие от 16S и 16S-подобных рРНК, взаимно комплементарны и образуют стабильный стержень (спираль H1) — общий черешок всей молекулы рРНК (см. рис. 6.2). Во-вторых, компактные домены 23S и 23S-подобных рРНК тесно слиты, взаимодействуя друг с другом за счет многочисленных нековалентных контактов и даже взаимопроникая друг в друга (см. рис. 6.1, **Б** цв. вкл.). Из этого следует, что молекулы 23S и 23S-подобных рРНК гораздо менее конформационно подвижны по сравнению с 16S рРНК и представляют собой более жесткую структурную основу большой рибосомной субъединицы. Что касается общего двуспирального черешка рРНК большой субъединицы эукариот, то ее 5'-концевая область представлена отщепленным фрагментом — 5,8S РНК, и 3'-концевая последовательность 23S-подобной (25S или 28S) рРНК образует двуспиральную структуру — черешок — с 5'-концевой последовательностью 5,8S рРНК, но последняя ассоциирована с большой молекулой рРНК еще и за счет образования двух дополнительных двойных спиралей. В хлоропластах высших растений 5'-концевая последовательность 23S рРНК образует двойной спиральный комплекс с 3'-концевой областью 4,5S рРНК.

В целом структура высокополимерной РНК больших рибосомных субъединиц как прокариот, так и эукариот состоит из шести доменов (I—VI), ограниченных относительно длинными двуспиральными черешками. В случае 23S рРНК из *E. coli* это спираль 15—24/516—525 (домен I); спираль 579—584/1256—1261 (домен II); спираль 1295—1298/1642—1645 (домен III); спираль 1648—1667/1993—2009 (домен IV); спираль 2043—2057/2611—2625 (домен V); спираль 2630—2643/1771—2788 (домен VI) (см. рис. 6.2). Домены I и III не обнаружены в митохондриальной 23S-подобной рРНК млекопитающих и трипаносоматид, поэтому их нуклеотидные последовательности не включены в универсальное ядро 23S и 23S-подобных рРНК, представленное на рис. 6.2 на сером фоне. Как следует из мутационного анализа, все основные функциональные участки большой рибосомной субъединицы располагаются в универсальном ядре 23S-подобной рРНК, а в вариативных областях не обнаружено мутаций, влияющих на активности рибосом. Интересно, что модифицированные нуклеотиды как в прокариотической, так и в эукариотической 23S-подобной рРНК сгруппированы главным образом в доменах II, IV и V, которые являются наиболее важными в функциональном отношении (см. подразд. 8.3 и 8.4).

Домен V 23S рРНК заслуживает особого внимания: он играет ключевую роль в формировании структур основных функциональных центров большой рибосомной субъединицы (см. гл. 8). Он, как и домен IV, располагается в основном на поверхности большой субъединицы, обращенной к малой субъединице, т.е. на контактирующей стороне большой субъединицы (см. рис. 6.2 и рис. 6.1 цв. вкл.). Его 5'-проксимальный субдомен (спирали Н73 — Н79) простирается от «шеи» большой субъединицы (борозды, отделяющей центральный выступ от тела) до бокового выступа, где он принимает участие в формировании участка связывания периферийного белка L1. Серединный субдомен (спирали Н80 — Н88) совместно с доменом II и 5S рРНК образует основу центрального выступа (головки) субъединицы, 3'-проксимальный субдомен (спирали Н89 — Н93) простирается в другую сторону, к основанию другого бокового выступа (палочкообразного выступа с белком L7/L12) и стабилизирует участок связывания факторов элонгации на доменах II и VI. В месте схождения 5'-проксимального и 3'-проксимального субдоменов образуется структура, ответственная за катализ транспептидации — пептидилтрансферазный центр рибосомы (см. подразд. 8.3).

6.5.2.2. Внутридоменные спираль-спиральные взаимодействия

Как и в случае 16S рРНК, в высокополимерной 23S рРНК домены компактны за счет взаимодействий между двуспиральными участками. Все те же типы взаимодействий, которые были описаны для 16S рРНК, присутствуют и здесь: коаксиальный стэкинг спиралей; тесные боковые взаимодействия малых желобков спиралей друг с другом за счет взаимного внедрения адениловых остатков (А-минорный мотив); взаимодействия рибозофосфатного остова одной спирали с группами малого желобка другой и «рибозные застёжки»; взаимодействия торцевых петель, в первую очередь тетрапетель, с «рецепторными» участками малых желобков спиралей; многочисленные Mg^{2+} -мостики между фосфатами рибозофосфатных остовов спиралей. Подавляющая часть этих взаимодействий была обнаружена в результате рентгеноструктурного анализа высокого разрешения (2,4 Å) большой рибосомной субъединицы (50S) археобактерии *Haloarcula marismortui*, проведенного группой Т. Стайтца (2000).

«А-минорный мотив» — наиболее распространенный и наиболее важный тип дальних взаимодействий не только между спиральями 23S рРНК, но и между ее одנותяжевыми участками (включая петли) и спиральями. Около 180 аденозинов 23S рРНК вовлечены в эти взаимодействия. Аденозины внедряются в малый желобок РНК своим «гладким» С2 — N3 краем, лишенным (в отличие от остальных азотистых оснований) других групп, и взаимодействуют в основном с 2'-гидроксисилами рибозных остатков. Наиболее прочное взаимодействие возникает при внедрении аденозина в район пары G:C — в этом случае в дополнение к взаимодействиям с рибозными остатками пары образуются водородные связи между N при С2 гуанина и N3 аденина, а также между O при С2 цитозина и 2'-гидроксисилом аденозина (см. рис. 1.18). Внедряемый аденозин может принадлежать неканонической паре двойной спирали, выпетленному адениловому нуклеотиду спирали или торцевой петле. Одנותяжевой участок с адениловыми остатками может также «слеплять» две спирали за счет внедрения своих аденозинов в оба малых желобка.

На основе данных рентгеноструктурного анализа рибосомной 50S субъединицы оказалось возможным впервые прямо идентифицировать взаимодействия са-

харофосфатных островов участков 23S рРНК через Mg^{2+} -мостики. Одиночные ионы Mg^{2+} и их кластеры видны преимущественно в тех местах третичной структуры, где особенно высока локальная концентрация фосфатных групп, и там они, очевидно, играют критическую роль в стабилизации компактной структуры.

6.5.2.3. Междоменные взаимодействия

Наиболее значимыми для организации «монокристаллической» третичной структуры 23S рРНК оказываются дальние комплементарные и межспиральные взаимодействия, связывающие различные домены между собой. Среди междоменных комплементарных взаимодействий насчитывается более десятка псевдоузлов; многие из них эволюционно консервативны и играют важную роль в стабилизации междоменных контактов. Здесь же можно найти и ряд «А-минорных» взаимодействий, когда аденозины одного домена внедряются в спирали другого домена. Довольно часты и междоменные спираль-петлевые взаимодействия типа «тетрапетля — рецептор тетрапетли» в малом желобке спирали. Таким образом, в отличие от 16S РНК домены в 23S РНК оказываются сильно «перешиты» друг с другом различными дальними взаимодействиями.

6.5.2.4. Общий вид третичной структуры

На рис. 6.7 и рис. 6.1, **Б** цв. вкл. приведена модель третичной структуры 23S рРНК, полученная в результате рентгеноструктурного анализа кристаллов рибосомных 50S субъединиц археи (археобактерии) *Haloarcula marismortui* с разрешением 2,4 Å (Стайтц и др., 2000). Видно, что шесть доменов рРНК, представленные разными цветами на рис. 6.1, **Б**, не образуют отдельных долей структуры, а плотно собраны вместе, составляя более или менее единый монокристалл. В целом форма 23S рРНК близка к полусферической, а верхушки доменов I, II и V образуют три выступа, или протуберанца, — соответственно два боковых и центральный, — на одной из сторон полусферы. Сравнение с изображением и морфологической моделью рибосомной 50S субъединицы (см. рис. 5.7) показывает их поразительное сходство, за исключением того, что в РНК выступы сильно редуцированы по сравнению с рибосомной частицей. Действительно, как показано далее, в рибосомной 50S частице выступы РНК значительно дополнены белками, а центральный выступ также и 5S рРНК.

6.5.3. 5S рибосомная РНК

120-нуклеотидная 5S рРНК представляет собой фактически седьмой домен РНК большой рибосомной субъединицы, надстраивающий центральный выступ и соединенный с доменами V и II (см. рис. 6.7). 5S рРНК традиционно считалась состоящей из пяти двуспиральных участков (см. рис. 6.3), однако на самом деле участки II, В и III вместе образуют одну спираль с необычно высокой концентрацией неканонических пар в середине и потому сильно искривленную, и участки IV и V тоже представляют собой непрерывную спираль с несколькими неканоническими парами в середине (у некоторых видов также с одним-двумя однонуклеотидными выпетливаниями). Таким образом, фактически 5S рРНК — струк-

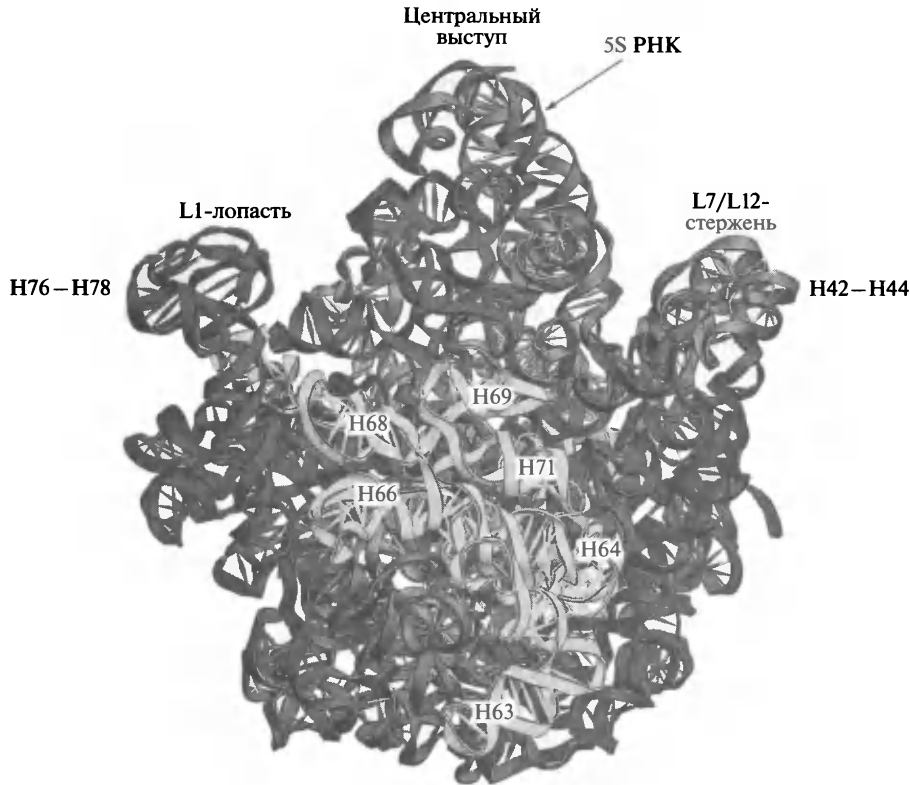


Рис. 6.7. Модель третичной структуры 23S рРНК археобактерии (археи) *Haloarcula marismortui* по данным рентгеноструктурного анализа 50S рибосомной субъединицы с разрешением 2,4 Å.

PDB ID 1FFK. Ban et al. (2000) *Science* 289: 905–920

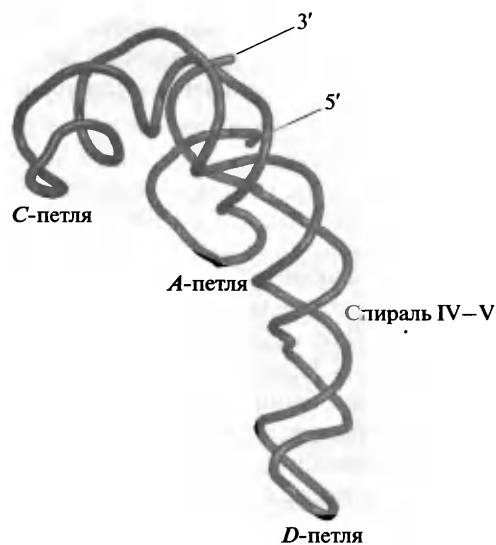


Рис. 6.8. Модель вторичной и третичной структур 5S рибосомной РНК в составе 50S рибосомной субъединицы археобактерии (археи) *Haloarcula marismortui* по данным рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,4 Å.

PDB ID 1FFK. Ban et al. (2000) *Science* 289: 905–920

тура из трех двойных спиралей (двух шпилек и черешка), исходящих из общего центра, называемого «неспаренным участком А». В третичной структуре 5S рРНК спирали II/III и IV/V вступают в коаксиальный стэкинг, а черешковая спираль оказывается направленной в другую сторону от изгиба спирали II/III (рис. 6.8).

Контакты 5S рРНК с 23S рРНК не очень обширны. Множественный контакт типа «А-минорного мотива» имеется между спиралью IV/V (в районе «петли» E) 5S рРНК и спиралью H38 домена II 23S рРНК. Он включает 6 «А-минорных» взаимодействий — 3 за счет аденинов 5S рРНК и 3 за счет аденинов 23S рРНК. Контакт 5S рРНК с доменом V 23S рРНК ограничивается, по-видимому, парой водородных связей.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 6

- Богданова, Е. С., Гаврилова, Л. П., Дворкин, Г. А., Киселев, Н. А., и Спирин, А. С. (1962). Изучение макромолекулярной структуры высокополимерной (рибосомальной) рибонуклеиновой кислоты из *Escherichia coli*. *Биохимия* **27**: 387—402.
- Спирин, А. С., Гаврилова, Л. П., Бреслер, С. Е., и Мосевичкий, М. И. (1959). Изучение макромолекулярной структуры инфекционной рибонуклеиновой кислоты из вируса табачной мозаики. *Биохимия* **24**: 938—947.
- Спирин, А. С., Киселев, Н. А., Шакулов, Р. С., и Богданов, А. А. (1963). Изучение структуры рибосом: Обратимое разворачивание рибосомных частиц в рибонуклеопротеидные тяжи и модель укладки. *Биохимия* **28**: 920—930.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905—920.
- Doty, P., Boedtker, H., Fresco, J. R., Haselkorn, R., and Litt, M. (1959). Secondary structure in ribonucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**: 482—499.
- Fresco, J. R., Alberts, B. M., and Doty, P. (1960). Some molecular details of the secondary structure of ribonucleic acid. *Nature* **188**: 98—101.
- Gavrilova, L. P., Ivanov, D. A., and Spirin, A. S. (1966). Studies on the structure of ribosomes: III. Stepwise unfolding of the 50S particles without loss of ribosomal protein. *J. Mol. Biol.* **16**: 473—489.
- Kisselev, N. A., Gavrilova, L. P., and Spirin, A. S. (1961). On configurations of high-polymer ribonucleic acid macromolecules as revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **3**: 778—783.
- Spirin, A. S. (1960). On macromolecular structure of native high-polymer ribonucleic acid in solution. *J. Mol. Biol.* **2**: 436—446.
- Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., and Koteliansky, V. E. (1978). Specific self-packing of the ribosomal 16S RNA. *FEBS Letters* **95**: 273—276.
- Vasiliev, V. D., and Zalite, O. M. (1980). Specific compact self-packing of the ribosomal 23S RNA. *FEBS Lett.* **121**: 101—104.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327—339.
- Woese, C. R., Magrum, L. J., Gupta, R., Siegel, R. B., Stahl, D. A., Kop, J., Crawford, N., Brosius, J., Gutell, R., Hogan, J. J., and Noller, H. F. (1980). Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Res.* **8**: 2275—2293.
- Woese, C. R., Guttell, R., Gupta, R., and Noller, H. F. (1983). Detailed analysis of high-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**: 621—669.

- Спирин, А. С. (1963). Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот. Изд-во АН СССР, Москва.
- Moore, P. B. (1999). Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 287 — 300.
- Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit

function. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 813 — 850.

- Saenger, W. (1987). Principles of nucleic acid structure. Springer-Verlag, New York — Berlin — Heidelberg.
- Spirin, A. S. (1963). Some problems concerning the macromolecular structure of ribonucleic acids. *Progr. Nucl. Acid Res.* **1**: 301 — 345.
- Spirin, A. S. (1964). Macromolecular Structure of Ribonucleic Acids. Reinhold Publ. Corp., New York.

РИБОСОМНЫЕ БЕЛКИ И ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА РИБОСОМЫ

7.1. Разнообразие и номенклатура рибосомных белков

Каждая из двух рибосомных субъединиц содержит много различных белков, и почти все они представлены только одной копией на рибосому. В этом заключается фундаментальное различие между структурно асимметричным рибонуклеопротеидом рибосомы и симметричными вирусными нуклеопротеидами, которые образуются за счет упорядоченной упаковки идентичных белковых субъединиц. Открытие, сделанное в пионерском исследовании Валлера (1961, 1964) и показавшее, что рибосома характеризуется многообразием белков, установило важный принцип структурной организации рибосом.

Лучшим методом аналитического разделения рибосомных белков является электрофорез в геле. Даже одномерный гель-электрофорез в денатурирующих условиях обеспечивает значительное разделение рибосомных белков по заряду и размеру молекул, а с помощью двумерного электрофореза в геле можно разделить все белки рибосомных частиц (Кальтшмидт и Виттманн, 1970). Среди рибосомных белков большинства организмов преобладают полипептиды умеренно основного характера, хотя присутствует также несколько нейтральных и кислых белков. Молекулярные массы рибосомных белков обычно варьируют от 10 до 30 кДа. Лишь незначительное количество белков имеет больший размер до 50—60 кДа (в частности, это два белка большой субъединицы рибосом млекопитающих и один белок малой субъединицы рибосом бактерий). С другой стороны, большая субъединица рибосом прокариот и эукариот содержит несколько (от трех до шести) белков или полипептидов с низкой молекулярной массой, имеющих длину всего 50—60 аминокислотных остатков и даже меньше.

Малая (30S) субъединица рибосом прокариот содержит около 20 различных белков, в то время как в большой субъединице (50S) присутствует около 30—35 белков. Эукариотические рибосомы содержат более широкий спектр белков:

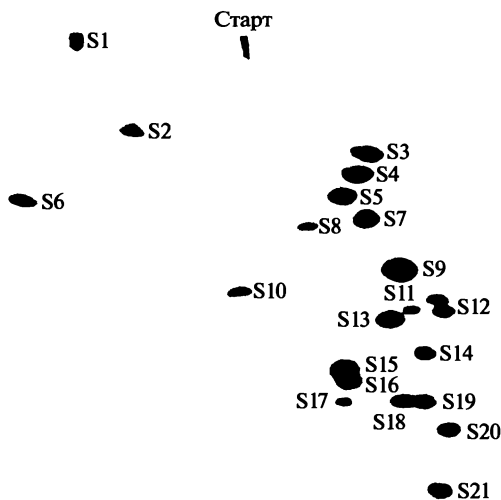


Рис. 7.1. Разделение рибосомных белков 30S рибосомных субъединиц *Escherichia coli* с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и номенклатура этих белков.

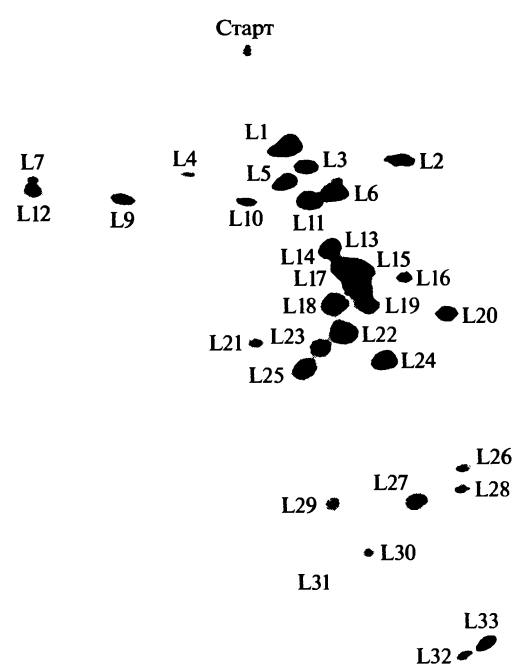
Первое направление (горизонтальное): 4%-й полиакриламидный гель с 8 М мочевиной, pH 8,6. Второе направление (вертикальное, сверху вниз): 18%-й полиакриламидный гель с 6 М мочевиной, pH 4,6.

Kaltschmidt and Wittmann (1970) *Anal. Biochem.* 36: 401—412; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1276—1282

малая (40S) субъединица — около 30 различных белков, а большая (60S) — около 50.

Как уже было сказано, полное аналитическое разделение всех белков рибосомы может быть достигнуто с помощью двумерного гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Например, для проведения электрофореза в первом направлении может быть использован 4—8%-й полиакриламидный гель с рН 8,6, а во втором направлении — 18%-й гель с рН 4,6. Эти условия приводят к разделению всех белков, входящих в состав 30S (рис. 7.1) и 50S (рис. 7.2) рибосомных субъединиц *E. coli*. Электрофоретическое разделение в первом направлении в относительно малоконцентрированном геле при нейтральных или слабощелочных значениях рН приводит к миграции кислых и нейтральных белков по направлению к аноду (влево), в то время как основные белки мигрируют по направлению к катоду (вправо); разделение происходит главным образом на основе их заряда. Электрофорез во втором направлении проводится в сильно сшитом геле при кислых значениях рН, и все белки мигрируют по направлению к катоду (вниз); в этом случае разделение происходит главным образом на основе молекулярных размеров компонентов (чем меньше размер, тем больше подвижность).

Разделение в описанной выше системе положено в основу номенклатуры рибосомных белков. Было предложено называть рибосомные белки, нумеруя их в направлении сверху вниз, как это видно на картах двумерного электрофоретического разделения (см. рис. 7.1 и 7.2). Белки малой рибосомной субъединицы (30S или 40S) обозначаются буквой S — *Small* (S1, S2, S3 и т.д.), а белки большой субъединицы (50S или 60S) обозначаются буквой L — *Large* (L1, L2, L3 и т.д.). Малая рибосомная субъединица *E. coli* содержит 21 белок, от S1 до S21. Большая рибосомная субъединица содержит 34 различных белка, от L1 до L36; пятно, первоначально обозначенное как L8, не является индивидуальным белком, а представляет собой комплекс, образованный белками L10 и L12, а пятна, обозначаемые как L7 и L12, соответствуют одному и тому же белку (белок L7 является N-ацетилированным производным белка L12). Самые низкомолекулярные белки большой рибосомной субъединицы (L30—L36), представляющие собой полипептиды основного характера, обычно плохо выявляются путем стандартного электрофореза, и потому белки L35 и L36 долго не были идентифицированы. Белок S20 малой рибосомной субъ-



единицы белками L10 и L12, а пятна, обозначаемые как L7 и L12, соответствуют одному и тому же белку (белок L7 является N-ацетилированным производным белка L12). Самые низкомолекулярные белки большой рибосомной субъединицы (L30—L36), представляющие собой полипептиды основного характера, обычно плохо выявляются путем стандартного электрофореза, и потому белки L35 и L36 долго не были идентифицированы. Белок S20 малой рибосомной субъ-

Рис. 7.2. Разделение рибосомных белков 50S рибосомных субъединиц *Escherichia coli* с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и номенклатура этих белков.

Условия разделения и литературные ссылки те же, что на рис. 7.1. Пятна маленьких белков — L34, L35, L36 — не видны на этой электрофореграмме

единицы оказался идентичным белку L26 большой субъединицы. Таким образом, в 70S рибосоме *E. coli* содержится 54 различных рибосомных белка. Кислый белок L7/L12 (120 аминокислотных остатков, молекулярная масса 12 200 Да) уникален в том смысле, что в рибосоме содержится четыре молекулы этого белка (у *E. coli*); он образует тетрамер с молекулярной массой около 50 000 Да. (Следует заметить, что количество копий этого белка, по-видимому, может варьировать у разных видов бактерий — во всяком случае, у гипертермофильной бактерии *Thermotoga maritima* обнаруживается шесть копий этого белка на рибосому. Имеются указания на то, что некоторые организмы способны обходиться двумя копиями.) За этим исключением все другие белки в рибосоме представлены единственной копией на рибосому. Размеры рибосомных белков *E. coli* приведены в табл. 7.1.

Таблица 7.1

Размеры рибосомных белков *Escherichia coli* (См. Wittmann-Liebold, В. (1986), in *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (eds. Hardesty, В., and Kramer, G.), p. 331, Springer-Verlag, New York. Данные по белкам L35 и L36 см. Wada, А., and Sako, Т. (1987) *J. Biochem.* **101**: 817—820.)

Белки малой субъединицы			Белки большой субъединицы		
Обозначение	Количество аминокислотных остатков	Молекулярная масса, кДа	Обозначение	Количество аминокислотных остатков	Молекулярная масса, кДа
S1	557	61,	L1	233	24,6
S2	240	26,6	L2	272	29,7
S3	232	25,9	L3	209	22,3
S4	203	23,1	L4	201	22,1
S5	166	17,5	L5	178	20,2
S6	135	15,7	L6	176	18,8
S7	157 (177)	17,1 (19,8)	L7/L12	120	12,2 (4 копии)
S8	129	14,0	L9	148	15,7
S9	129	14,7	L10	164	17,6
S10	103	11,7	L11	141	14,9
S11	128	13,7	L13	142	16,0
S12	123	13,6	L14	123	13,5
S13	117	13,0	L15	144	15,0
S14	98	11,2	L16	136	15,3
S15	88	10,1	L17	127	14,4
S16	82	9,2	L18	117	12,8
S17	83	9,6	L19	114	13,0
S18	74	8,9	L20	117	13,4
S19	91	10,3	L21	103	11,6
S20	86	9,6	L22	110	12,3
S21	70	8,4	L23	100	11,2
			L24	103	11,2

Белки малой субъединицы			Белки большой субъединицы		
Обозначение	Количество аминокислотных остатков	Молекулярная масса, кДа	Обозначение	Количество аминокислотных остатков	Молекулярная масса, кДа
			L25	94	10,7
			L26 = S20	86	9,6
			L27	84	9,0
			L28	77	8,9
			L29	63	7,3
			L30	58	6,4
			L31	62	7,0
			L32	56	6,3
			L33	54	6,3
			L34	46	5,4
			L35	64	7,0
			L36	38	4,4

Первоначально рибосомные белки каждого вида имели свою собственную номенклатуру — в соответствии с их собственной картиной электрофоретического разделения. Так, белки малой субъединицы рибосомы *E. coli* обозначались как EcS (EcS1, EcS2 и т.д.), большой субъединицы — EcL (EcL1, EcL2 и т.д.); белки малой субъединицы рибосомы *Bacillus stearothermophilus* — BsS (BsS1, BsS2 и т.д.). Подобным образом рибосомные белки дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), крысы и человека имеют префиксы Y, R и H соответственно. В этой номенклатуре один и тот же номер может относиться к негомологичным белкам различных видов. После того как стало ясно, что большая часть рибосомных белков эволюционно консервативна и может быть найдена гомология между белками различных видов, была предложена универсальная номенклатура. В настоящее время широко используется универсальная номенклатура рибосомных белков бактерий, основанная на нумерации белков рибосом *E. coli*. Универсальная номенклатура эукариотических рибосомных белков, основанная на нумерации белков крысы или человека, также была введена. Нужно упомянуть, что по крайней мере 30 белков рибосом млекопитающих проявляют некоторую гомологию последовательности с эубактериальными рибосомными белками и, таким образом, могут быть соотнесены с соответствующими белками *E. coli* (см. обзор: Wool, I. G., Chan, Y.-L., & Glöck, A., 1996). Соответствие (гомология) между некоторыми рибосомными белками прокариот и эукариот указано в табл. 7.2.

Рибосомы крысы и человека имеют 33 белка в 40S субъединице (от Sa, S2, S3, S3a, до S30) и 47 белков в 60S субъединице (от P0, P1, P2, L3 до L41). Как и в случае рибосом *E. coli*, кислые белки P1 и P2 большой рибосомной субъединицы, которые являются аналогами бактериального белка L7/L12, представлены в количестве более одной молекулы на рибосому: оба образуют гомодимеры, и два димера могут соединяться друг с другом.

Корреляция (гомология) между рибосомными белками прокариот (зубактерии и археи) и эукариот (грибы и млекопитающие) (I. Wool, Y.-L. Chan and A. Glück, in: «*Translational Control*» (eds. J. W. B. Hershey, M. B. Mathews and N. Sonenberg.), pp. 685—732, CSHL Press, 1996.)

Белки малой субъединицы		Белки большой субъединицы	
<i>Escherichia coli</i> , <i>Halobacterium marismortue</i>	Дрожжи, крыса	<i>Escherichia coli</i> , <i>Halobacterium marismortue</i>	Дрожжи, крыса
Ес или Hm S2	Y или R Sa	Ес или Hm L2	Y или R L8
S3	S3	L3	L3
S4	S9	L5	L11
S5	S2	L6	L9
S7	S5	L7/L12	P1, P2
S8	S15	L10	P0
S9	S16	L11	L12
S10	S20	L13	L3
S11	S14	L14	L23
S12	S23	L15	L27a
S13	S18	L18	L5
S14	S29	L22	L17
S15	S13	L23	L23a
S17	S11	L24	L26
S19	S15	L29	L35
		L30	L7

7.2. Первичные структуры белков

Сравнение первичных структур рибосомных белков *E. coli* показало отсутствие какой-либо существенной гомологии в их аминокислотных последовательностях. Таким образом, рибосома *E. coli* содержит 54 различные аминокислотные последовательности, не обладающие ни общими блоками, ни гомологичными областями (см. обзор: Wittmann-Liebold, B., 1984). Подобное же заключение может быть сделано на основе анализа аминокислотных последовательностей рибосомных белков других зубактерий, архебактерий (архей) и эукариот. Каких-либо принципиальных особенностей первичных структур рибосомных белков по сравнению с нормальными растворимыми глобулярными белками не обнаружено. Однако, как и можно было ожидать, большая их часть содержит значительное количество лизиновых и аргининовых остатков, иногда группирующихся в обогащенные лизином и аргинином блоки, которые, очевидно, прямо обуславливают РНК-связывающие свойства рибосомных белков и создают суммарный положительный заряд их молекул. Многие рибосомные белки не содержат триптофана.

Несколько эукариотических рибосомных белков фосфорилированы по остаткам серина. К этой группе относятся кислые белки P0, P1 и P2. Фосфорилирование стабильно, т.е. не зависит от физиологических изменений, и необходимо для сборки и функционирования рибосомы. Фосфорилирован также эукариотический белок S6, в котором несколько остатков серина сгруппированы у С-конца;

в ответ на различные физиологические стимулы они могут быть мишенями для различных протеинкиназ — пример изменяемого фосфорилирования. По-видимому, фосфорилирование белка S6 не является предпосылкой для сборки или функционирования рибосомы. Как и в случае ацетилирования N-концевого серина прокариотического белка L12, функциональное значение этой варибельной модификации белка S6 неизвестно.

Как уже упоминалось, первичные структуры рибосомных белков эволюционно консервативны. Белки рибосом крысы и человека либо полностью идентичны (32 белка), либо различаются лишь по нескольким аминокислотным остаткам в цепи; идентичность варьирует от 90 до 100 %. Таким образом, можно предполагать, что рибосомные белки всех млекопитающих почти идентичны. Существует значительная гомология аминокислотных последовательностей между эквивалентными рибосомными белками двух таксономически различных групп эубактерий — грамтрицательных (*Escherichia*) и грамположительных (*Bacillus*); как правило, по крайней мере 50 % аминокислотных остатков в полипептидных цепях соответствующих белков идентичны. Также была обнаружена значительная гомология аминокислотных последовательностей для рибосомных белков различных эволюционно далеких эукариотических организмов: животные, высшие растения и грибы имеют от 40 до 80 % идентичности в последовательностях эквивалентных рибосомных белков. Заслуживает внимания тот факт, что архебактерии (или археи) также демонстрируют определенную гомологию (идентичность от 20 до 50 %) между их рибосомными белками и эквивалентными рибосомными белками эукариот, но существенно меньшую гомологию с рибосомными белками эубактерий. Возвращаясь к эукариотическим рибосомам, можно сказать, что по крайней мере половина их рибосомных белков имеет эквиваленты или гомологи среди прокариотических рибосомных белков (см. табл. 7.2), в то время как другие белки уникальны для эукариот.

7.3. Пространственные структуры белков

Пространственные структуры рибосомных белков были изучены методами рентгеноструктурного анализа как кристаллов самих изолированных белков, так и кристаллов рибосомных субъединиц, т. е. в составе рибосомных частиц. Структура ряда изолированных белков изучена также методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в растворе. Главными объектами этих исследований были рибосомные частицы прокариот — 30S субъединицы эубактерий и 50S субъединицы эубактерий и архей. Результаты, полученные разными методами, в значительной степени совпадают.

В основном рибосомные белки характеризуются компактными, типично глобулярными конформациями с хорошо развитой вторичной и третичной структурами (Сердюк и др., 1978), но многие из них имеют также довольно длинные неструктурированные N-концевые или C-концевые «хвосты» (например, бактериальные белки S3, S11, S12 с N-«хвостами» и белки S6, S9, S13, S16 с C-«хвостами»). Иногда из глобулярной части может торчать длинная α -спираль (белок S2), чаще — длинная β -шпилька (белки S5, S7, S10). Эти структурные «удлинения», очень характерные для рибосомных белков, обычно глубоко вклиниваются в рНК, образующую ядро частицы, и, по-видимому, играют важную роль в стабилизации компактной структуры рРНК (см. далее).

Конформации рибосомных белков в рибосоме в свою очередь стабилизируют-ся за счет взаимодействий с РНК, а также с другими рибосомными белками. После выделения из рибосомы многие рибосомные белки нестабильны и могут легко денатурировать. По этой причине физические исследования изолированных рибосомных белков и особенно их кристаллизация и рентгеноструктурный анализ проводились главным образом с белками из термофильных организмов, таких как *Bacillus stearothermophilus* и *Thermus thermophilus*, которые характеризуются более стабильными пространственными структурами.

Глобулярный домен белка L7/L12 *E. coli* (фрагмент 47 — 120) был первым белковым элементом рибосомы, закристаллизованным и изученным (Лильяс и др., 1980) с помощью рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением (1,7 Å). Вторичная структура домена включает α -спирали и β -тяжи; они чередуются вдоль полипептидной цепи в следующем порядке: $\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta$. Общий характер их укладки может быть представлен как глобула, состоящая из двух слоев: три α -спирали уложены в один слой, в то время как антипараллельная β -структура из трех тяжей образует другой слой (рис. 7.3, А). Двуслойный характер укладки в глобулярных доменах, подобный тому, что был обнаружен в глобулярном домене белка L7/L12, оказался типичен и для других рибосомных белков (рис. 7.4). Так, белок S6 бактериальных рибосом является однодоменным ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$), в нем две α -спирали лежат на четырехтяжном β -слое. Интересно, что этот же тип сворачивания найден в домене V фактора элонгации EF-G (см. гл. 11, рис. 11.2), в ядерном белке U1A сплайсосом эукариот и в некоторых других белках транскрипционного и трансляционного аппаратов клеток (например, эукариотический мРНК-связывающий белок YB; см. подразд. 2.4, рис. 2.6). Белок S5 — двудоменный с плотно ассоциированными половинками, в нем С-концевой домен ($\beta\beta\alpha\beta\alpha$) имеет экспонированный наружу β -слой, лежащий на двух α -спиралях. Похожий тип сворачивания можно видеть в домене IV фактора элонгации EF-G (см. рис. 11.2). Белок L1 также двудоменный; его РНК-связывающий домен состоит из двух слоев, две α -спирали лежат на четырехтяжном β -слое. Этот β -слой (особенно его средние тяжи с их основными и ароматическими аминокислотными остатками) играет важную роль в узнавании и связывании рРНК. Другой двудоменный белок — S8 — имеет N-концевой домен ($\alpha\beta\alpha\beta\beta$), в котором трехтяжный β -слой



Рис. 7.3. Третичная и вторичная структуры рибосомного белка L7/L12 (схематическое изображение в формате «ribbon»).

А: глобулярный домен мономера белка L7/L12 по данным рентгеноструктурного анализа. Leijonmarck et al. (1980) *Nature* **286**: 824—826. Liljas (1982) *Progress Biophys. Mol. Biol.* **40**: 161—228. Б: димер белка L7/L12 по данным ЯМР-спектроскопии. PDB ID 1RQU, 1RQV, 1RQT, 1RQS. Bocharov et al. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**: 17697—17706

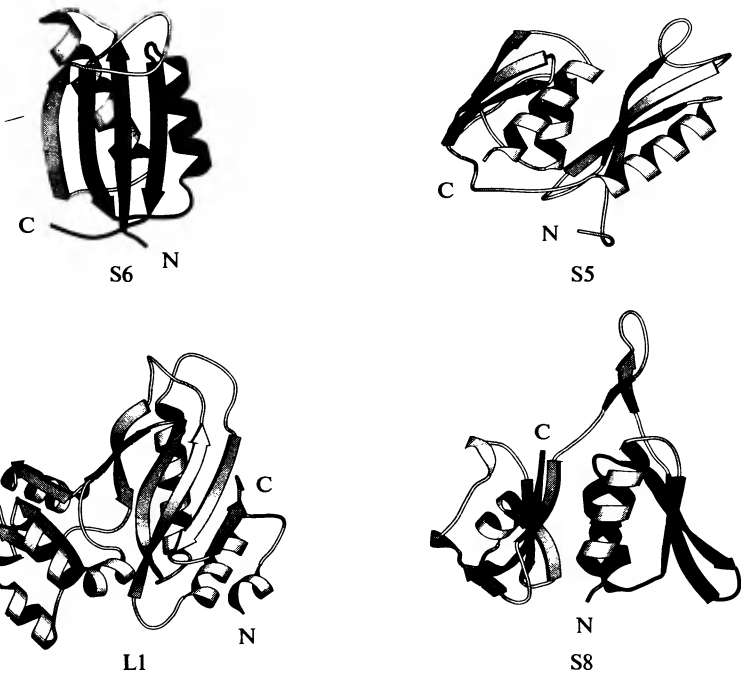


Рис. 7.4. Третичная и вторичная структуры некоторых глобулярных рибосомных белков с глобулярными доменами, характеризующимися двуслойной структурой типа «слой α -спиралей на β -листе» (схематическое изображение в формате «gibbon»).

Белок S6 из рибосом *Thermus thermophilus*: Lindahl et al. (1994) *EMBO J.* **13**: 1249—1254.

Белок S5 из рибосом *Bacillus stearothermophilus*: Ramakrishnan and White (1992) *Nature* **358**: 768—771.

Белок L1 из рибосом *Thermus thermophilus*: Nikonov et al. (1996) *EMBO J.* **15**: 1350—1359.

Белок S8 из рибосом *Thermus thermophilus*: Nevskaya et al. (1998) *J. Mol. Biol.* **279**: 233—244.

одной стороной лежит на двух α -спиральных, а другой экспонирован для взаимодействия с рРНК.

Бочкообразная структура из пяти β -тяжей — тоже типичный способ укладки рибосомных белков. Представитель таких белков — бактериальный белок S17 (рис. 7.5, А). Белок S17 — РНК-связывающий, он тесно взаимодействует с РНК. Известно, что такой же характерный мотив сворачивания есть у многих нерибосомных РНК-связывающих белков, в том числе цитоплазматических мРНК- и ядерных пре-мРНК-связывающих белков эукариот (см., например, рис. 2.6). Та-

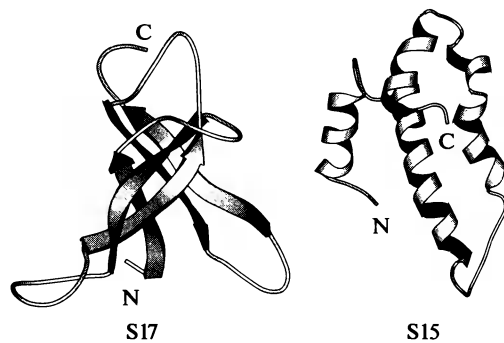


Рис. 7.5. Третичная и вторичная структуры представителей глобулярных рибосомных белков β -структурного и α -спирального типов (схематическое изображение в формате «gibbon»).

β -Структурный белок (« β -бочонок») S17 из рибосом *Bacillus stearothermophilus*: Jaishree et al. (1996) *Biochemistry* **35**: 2845—2853.

α -Спиральный белок S15 из рибосом *Thermus thermophilus*: Berglund et al. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**: 20—23

кие бочкообразные β -структурные белки могут также быть рассмотрены как двуслойные глобулы, где один β -слой лежит на другом, с РНК-связывающим участком на одном из них. Среди РНК-связывающих рибосомных белков присутствуют также полностью α -спиральные белки, такие как S15 (рис. 7.5, **Б**).

Возвращаясь к структуре белка L7/L12 *E. coli*, следует сказать, что его С-проксимальный глобулярный домен, имеющий типичную $\alpha\beta$ -структуру, соединен неструктурированной гибкой перетяжкой («шарнирным участком») с N-концевым доменом, представляющим собой нестабильную, флуктуирующую α -спираль, которая стабилизируется только при образовании гомодимера этого белка (см. рис. 7.3, **Б**). Поэтому экспериментальное изучение полной структуры белка L7/L12 оказалось возможным лишь в форме его димеров (Гудков, Арсеньев и др., 1996, 2004; см. подразд. 7.4).

7.4. Белковые комплексы

Относительно мягкий метод диссоциации рибосомных белков из рибосом включает обработку моновалентными солями, такими как CsCl, LiCl или NH₄Cl, в высоких концентрациях. В результате этой обработки многие белки диссоциируют в виде групп, а не индивидуальных молекул, что отражает определенную кооперативность удержания белков в составе рибосомных субъединиц. В ряде случаев подобные группы белков могут быть удалены из частиц как относительно стабильные комплексы.

Пентамер, образованный одной молекулой белка L10 и тетрамером белка L7/L12, является наиболее ярким примером стабильного белкового комплекса в бактериальных рибосомах. Он может быть селективно удален из 50S рибосомной субъединицы путем обработки смесью 1M NH₄Cl и этанола (1:1). В результате данной обработки 50S субъединица теряет свой боковой палочкообразный стержень («палец»). Глобулярные структуры белков L10 и L7/L12 в комплексе значительно более стабильны, чем в индивидуальном состоянии. Пентамерный комплекс L10•(L7/L12)₄ в рибосоме ассоциирован через белок L10 с белком L11. Наиболее прочное взаимодействие, приводящее к образованию очень стабильного димера, существует между двумя молекулами белка L7/L12. Пространственная структура L7/L12 димера была определена как с помощью ЯМР в растворе (Гудков, Арсеньев и др., 2004), так и с помощью рентгеноструктурного анализа его кристаллов (Валь и др., 2005). Было показано, что мономерная субъединица белка L7/L12 состоит из двух доменов: глобулярного С-концевого с 70—80 аминокислотными остатками и неглобулярного N-концевого домена длиной около 40 аминокислотных остатков в форме α -спиральной шпильки; домены соединены гибким «шарнирным» участком, легко расщепляемым протеазами. Момеры расположены параллельно и прочно ассоциированы своими спиральными N-концевыми доменами, в то время как два глобулярных домена находятся в слабом контакте друг с другом, если вообще контактируют. При взаимодействии две α -спиральные N-концевые шпильки образуют четырехспиральный антипараллельный пучок, как изображено на рис. 7.3, **Б**. Именно N-концевая часть димера ответственна за взаимодействие с белком L10 и интеграцию с рибосомой, в то время как глобулярные домены обладают подвижностью относительно остальной (основной) части рибосомы, будучи подвешенными на гибких шарнирах. По-видимому, два димера висят на белке L10 более или менее независимо друг от дру-

га, образуя четыре подвижные глобулы пентамера L10•(L7/L12)₄. В эукариотических рибосомах присутствует подобный пентамерный комплекс кислых рибосомных белков P0•P1₂•P2₂, который может быть селективно удален из 60S субъединицы, что также приводит к потере ее стержня (палочкообразного выступа).

Другой пример белкового комплекса — пара белков S6•S18 в рибосомах *E. coli*. Пространственная структура белка S18 в индивидуальном состоянии весьма нестабильна, и белок с трудом может быть выделен в глобулярном (неденатурированном) состоянии. Однако когда эти белки образуют комплекс, они стабилизируют друг друга. Плотный комплекс друг с другом в головке 30S рибосомной частицы образуют также белки S3•S10•S14, удерживаемые вместе тесными гидрофобными взаимодействиями. В другом комплексе, находящемся на теле 30S частицы, — S4•S5•S8 — белки связаны преимущественно электростатическими взаимодействиями и водородными связями. В комплексе друг с другом в составе 30S рибосомной частицы находятся также белки S7•S9, S13•S19 и др. Имеются, однако, и рибосомные белки-одиночки. К ним относятся белки S12, S16 и S20 малой (30S) рибосомной субъединицы.

7.5. Взаимодействия белков с рибосомной РНК

Все рибосомные белки, кроме димеров L7/L12 большой (50S) субъединицы рибосомы, непосредственно взаимодействуют с рРНК, т.е. являются РНК-связывающими белками. Эти взаимодействия в основном электростатические и возникают между основными группами белков и фосфатами рибозофосфатных остовов РНК, иногда с участием водородных связей между 2'-гидроксилами рибозных остатков и электроотрицательными атомами аминокислотных остатков. Вместе с тем взаимодействия очень специфичны: каждый белок имеет свою «посадочную площадку» на компактно свернутой РНК. Считается, что специфичность взаимодействия обусловлена узнаванием белками специфических локальных рельефов рРНК. К этому важно добавить, что поверхность взаимодействия рибосомных белков с РНК, как правило, велика — около одной трети всей поверхности белковой молекулы. Особенно тесно с РНК взаимодействуют неглобулярные «хвосты», которые, как уже отмечалось, могут внедряться между спиралями РНК глубоко в рибосомную частицу. Естественно, такое взаимодействие неструктурированного «хвоста» с РНК заставляет его принимать специфическую фиксированную конформацию в составе рибосомы.

В малой (30S) субъединице рибосомы большинство белков довольно четко распределено по трем компактным доменам рРНК: белки S4, S5, S12, S16, S17, S20 связаны с 5'-концевым доменом 16S рРНК (тело субъединицы), белки S6, S8, S11, S15, S18, S21 расположены на ее срединном домене (боковая лопасть), а белки S3, S7, S9, S10, S13, S14, S19 ассоциированы с ее основным 3'-проксимальным доменом (головка субъединицы). В то же время некоторые белки могут обеспечивать контакт между доменами рибосомной субъединицы. Так, белок S3 осуществляет контакт между телом и головкой субъединицы, а белок S5 имеет контакт с белком S8 на боковой лопасти («платформе»). Белок S12, расположенный на теле субъединицы, контактирует с примыкающей к 3'-домену частью длинной спирали h44 концевого минорного домена.

Белки связываются главным образом со спиральными участками доменов рРНК и всегда не менее чем с двумя спиралями одновременно, а чаще всего с тремя-

четырьмя, тем самым стабилизируя и цементируя компактный домен. Ряд белков, называемых сердцевинными, или ядровыми (*core proteins*), играют ключевую — иницирующую — роль в сборке четвертичной структуры доменов (см. подразд. 7.6); они взаимодействуют с рНК в местах разветвления спиралей. Например, белок S4 «сидит» в районе разветвления спиралей h3, h4, h16, h17 и h18 5'-концевого домена, белок S7 — в районе h29, h30, h41, h42 3'-проксимального домена, а белки S8 и S15 — в районе h20, h21, h22 срединного домена (см. рис. 6.1).

Ситуация с взаимодействием между белками и рНК в большой (50S) рибосомной субъединице существенно отличается от таковой в малой субъединице. Ранее отмечалось, что домены рНК 50S субъединицы, в противоположность относительно подвижным доменам 16S рНК, тесно собраны в единый монокристаллит. Оказалось, что белки 50S субъединицы способствуют этому слиянию и в основном имеют междоменное расположение, заполняя щели и полости между доменами. Особенно следует отметить низкомолекулярные белки L30—L36, представляющие собой, как правило, несвернутые полипептидные цепи основного характера, внедряющиеся в глубь ядра 23S рНК. Только 7 белков 50S субъединицы имеют внутридоменную локализацию, а остальные взаимодействуют с двумя или более доменами 23S рНК. Из них выделяется белок L22 — он взаимодействует сразу со всеми шестью доменами 23S рНК. Среди белков, взаимодействующих лишь с одним доменом 23S рНК, следует отметить белки двух боковых выступов 50S субъединицы: белок L1, сидящий на выступе домена V (спирали H77-H78), и белки L10 и L11 на выступе домена II (спирали H42—H43—H44; см. рис. 6.2), к которым присоединяются два димера белка L7/L12, образуя стержнеобразный выступ («палец») большой рибосомной субъединицы. Кстати, эти два «удлинения» боковых протуберанцев являются единственными морфологическими деталями чисто белковой природы в большой рибосомной субъединице; все остальные морфологические черты определяются только формой самой рНК.

Рибосомная 5S рНК, как отмечалось выше, непосредственно связана в основном с доменом V 23S рНК на верхушке центрального выступа 50S субъединицы, и в то же время тесно ассоциирована с тремя белками — L5, L18 и, в случае рибосом *E. coli*, L25, которые взаимодействуют также с доменом II 23S рНК у основания центрального выступа (см. рис. 6.7 и рис. 6.1 цв. вкл.). Интересно, что в рибосомах *Thermus thermophilus* белок L25 заменен другим белком — TtL5, который в два раза больше EcL25 и имеет низкую степень гомологии с ним. Показано, что у эукариот только один белок (RL5 или YL5) образует стабильный комплекс с 5S рНК; N-концевая часть этого белка гомологична белку EcL18 (см. табл. 7.2), а C-концевая часть может быть функционально эквивалентна EcL5. Таким образом, белки, находящиеся в комплексе с 5S рНК, представляются гораздо менее консервативными, чем другие элементы рибосомной структуры.

7.6. Разборка и самосборка рибосомных частиц

7.6.1. Разборка («раздевание»)

Если рибосомные субъединицы инкубировать в растворе с высокой ионной силой при достаточной концентрации Mg^{2+} , то компактность субъединиц сохраняется, но рибосомные белки частично диссоциируют. Эта диссоциация является результатом ослабления электростатических взаимодействий между отрица-

тельно заряженными фосфатными группами рРНК и положительно заряженными группами рибосомных белков при высокой ионной силе. Как в процессе инкубации при высокой концентрации соли, так и при постепенном увеличении ионной силы группы белков последовательно отщепляются от частиц, что приводит к образованию серии дефицитных по белку производных, сохраняющих компактно свернутую РНК. Другими словами, наблюдается последовательная ступенчатая разборка («раздевание») рибосомных частиц (рис. 7.6) (Спирин и др., 1965; Лерман, Спирин и др., 1966; Осава с сотр., 1968).

Чаще всего для такой последовательной разборки рибосомных частиц используют высокие концентрации LiCl или CsCl. На рис. 7.6 видно, что в случае 30S рибосомных субъединиц *E. coli* инкубация с высокими концентрациями солей сначала освобождает такие относительно слабо связанные белки, как S1, S2, S3, S14 и S21; удаление этих белков приводит к образованию 28S частиц с содержанием белка 30 % и плавучей плотностью в растворе CsCl около 1,67 г/см³. (Чем меньше относительное содержание белка в рибонуклеопротеидных частицах, тем

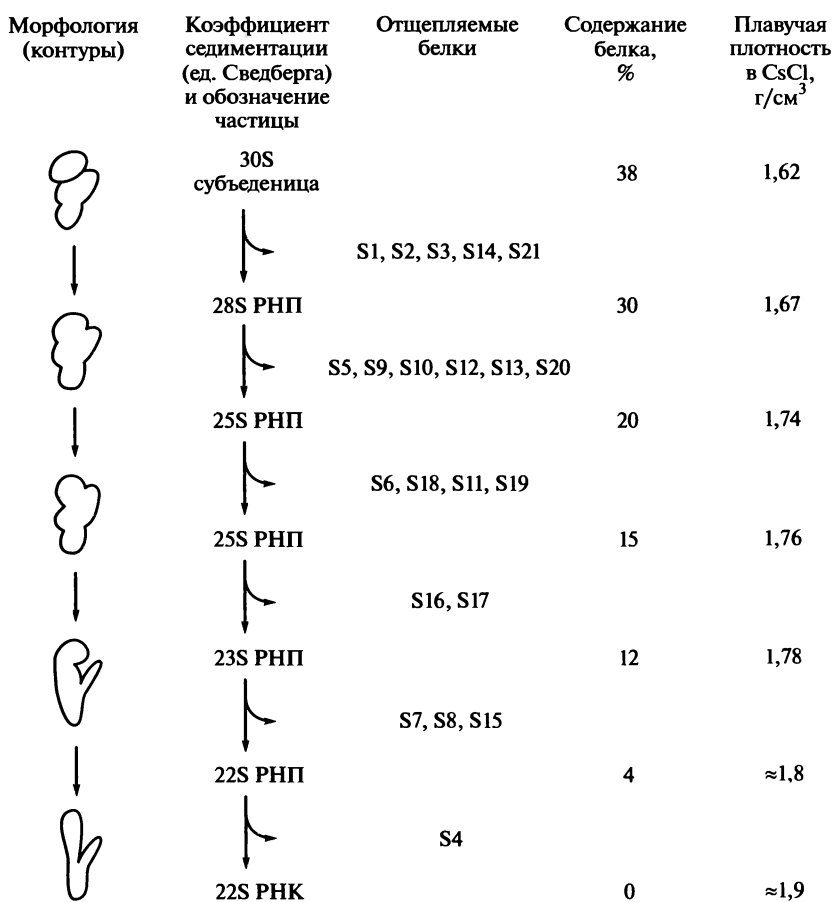


Рис. 7.6. Схема процесса разборки («раздевания») 30S рибосомной субъединицы под действием повышающейся концентрации соли в растворе (до 5 М CsCl или 3,5 М LiCl при 5 мМ MgCl₂).

Пояснения см. в тексте

выше их плавающая плотность, вплоть до величины около $1,9 \text{ г/см}^3$, характерной для чистой рНК.) Инкубация при более высокой концентрации соли приводит к отщеплению следующей порции белков — S5, S9, S10, S12, S13 и S20; полученные 25S частицы содержат почти половину изначального количества белка (20%), и их плавающая плотность в растворе CsCl равна $1,74 \text{ г/см}^3$. При концентрациях 3,0—3,5 M LiCl или во время длительного центрифугирования в растворе 5 M CsCl освобождаются белки S6, S11, S16, S17, S18 и S19, и остающиеся 23S частицы содержат всего четыре рибосомных белка: S4, S7, S8 и S15. Отделение последней группы белков от рНК требует более радикальной обработки комбинацией высокой концентрации соли и мочевины.

Сушественно, что диссоциация большей части белков из рибосомных частиц не вызывает разрушения общей третичной структуры и компактности рНК. Наблюдения процесса последовательного «раздевания» 30S субъединицы *E. coli*, сделанные с помощью электронного микроскопа, показали, что удаление половины всех белков не приводит к значительным морфологическим изменениям частиц: они сохраняют тот же размер, соотношение осей (2:1) и характерное разделение на головку, тело и боковую лопасть. Более того, даже после удаления 15 из 21 рибосомных белков можно видеть частицы, морфологически подобные исходным 30S субъединицам. Сведения о компактности ррНК в частицах с различным содержанием белков, полученные методами рассеивания рентгеновских лучей и нейтронов, были подтверждены электронно-микроскопическими наблюдениями: 16S ррНК, сохраняющая только шесть белков, а именно S4, S7, S8, S15, S16 и S17, поддерживает компактность и форму, характерную для рНК в составе 30S рибосомной субъединицы (см. обзор: Vasiliev, V. D., et al., 1986).

Окончательное «раздевание» 16S ррНК — удаление вышеуказанных белков, называемых «сердцевинными» (core proteins), — может приводить к небольшим видимым изменениям в частицах, в первую очередь к некоторому уменьшению компактности рНК и, соответственно, увеличению линейных размеров примерно на одну четверть. Очевидно, что без этих белков, даже при столь высокой ионной силе, экранирование зарядов рНК оказывается недостаточным для поддержания компактности сворачивания. Тем не менее при повышенной концентрации Mg^{2+} и умеренной ионной силе, а также при добавлении диаминов и полиаминов (путресцина и спермидина) свободную 16S ррНК без белков можно сделать достаточно компактной, так что она сохраняет свой специфический способ сворачивания; в электронный микроскоп ее можно видеть как характерную Y-образную частицу, контуры которой хорошо вписываются в контуры 30S рибосомной субъединицы (см. подразд. 6.4.2). Это позволяет считать, что основной рисунок сворачивания 16S ррНК определяется и поддерживается присущими ей внутримолекулярными взаимодействиями. Вместе с тем шесть «сердцевинных» белков (S4, S7, S8, S15, S16 и S17), связывающихся с 16S ррНК в районах основных разветвлений ее спиралей, играют, очевидно, важнейшую роль в стабилизации полностью свернутой, компактной конформации молекулы рНК как целого.

Подобная же тенденция может быть отмечена во время разборки 50S рибосомной субъединицы *E. coli*. 23S ррНК сохраняет свою первоначальную компактность до стадии, когда 9 из 32 белков, а именно L2, L3, L4, L13, L17, L20, L21, L22 и L23, сохраняются в частицах. Дальнейшее удаление белков приводит к уменьшению компактности, которая тем не менее сохраняется достаточно высокой, и общая форма молекулы не претерпевает значительных изменений.

Таким образом, «разделение», или разборка, рибосомных частиц ясно демонстрирует, что высокомолекулярная РНК играет каркасную роль в четвертичной структуре рибосомных частиц. Явление разворачивания с удержанием всех рибосомных белков на РНК (см. подразд. 6.4.3) показывает, что цепь РНК служит ковалентно непрерывным остовом частицы, несущим все рибосомные белки. Разборка, в ходе которой основная компактность и форма РНК остаются неизменными, дает основание утверждать, что третичная структура РНК формирует трехмерный каркас для надлежащего пространственного расположения белков.

7.6.2. Сборка белков на РНК (реконструкция)

Разборка рибосомы обратима; это означает, что в надлежащих ионных условиях рибосомные частицы могут быть реконструированы из рРНК и белков, включая восстановление их функциональных активностей (Лерман, Спири́н др., 1966; Спири́н и Белицина, 1966; Меселсон с сотр., 1966; Номура с сотр., 1966; Трауб и Номура, 1968; Мицушима и Номура, 1970; Эрдманн и Номура, 1970). Реконструировать бактериальные рибосомные частицы, как 30S, так и 50S, можно из изолированных рРНК и полного набора индивидуальных рибосомных белков. Условия для сборки рибосомных частиц *E. coli* включают: 1) умеренную ионную силу (от 0,3 до 0,5), 2) достаточно высокую концентрацию Mg^{2+} (от 10 до 30 мМ), 3) повышенную температуру (от 40 до 50 °С). Более высокая ионная сила подавляет взаимодействия между белками и РНК, в то время как при более низкой ионной силе существенно возрастает вклад конкурирующих неспецифических взаимодействий между белками основного характера и отрицательно заряженным полирибонуклеотидом. Относительно высокая концентрация Mg^{2+} необходима главным образом для поддержания третичной и вторичной структур РНК, которые обеспечивают каркас для пространственного размещения белков. В целом буфер для реконструкции обеспечивает те условия, в которых рРНК достаточно компактна в изолированном состоянии и поддерживает свою уникальную форму. Полагают, что повышенная температура необходима для облегчения структурной перестройки промежуточного рибонуклеопротеидного комплекса из менее компактной в более компактную конформацию.

Первыми белками, которые связываются с рРНК в процессе самосборки, являются «сердцевинные» белки, взаимодействующие с РНК независимо друг от друга. В случае 30S субъединицы *E. coli* это белки S4, S7, S8, S15 и S17; вместе с ними связывается и белок S16. Присоединение перечисленных белков (рис. 7.7, стадия I) предшествует переходу образующегося промежуточного рибонуклеопротеида из менее компактного состояния в более компактное (см. рис. 7.7, стадия II). По-видимому, именно этот переход требует повышенной температуры во время самосборки. В результате перехода 16S рРНК почти достигает того максимально компактного состояния, которое характерно для нее в зрелой 30S рибосомной субъединице.

Белки S20, S6•S18, S5, S9, S11 и S13•S19 могут входить в комплекс одновременно с вышеупомянутыми белками даже до перехода комплекса в более компактное состояние. Однако на рис. 7.7, где схематически показаны последовательность и взаимозависимость связывания белков в процессе реконструкции 30S субъединицы *E. coli*, включение вышеназванных белков в рибонуклеопротеид представлено как стадия III самосборки, поскольку эти белки, даже когда они связаны, не

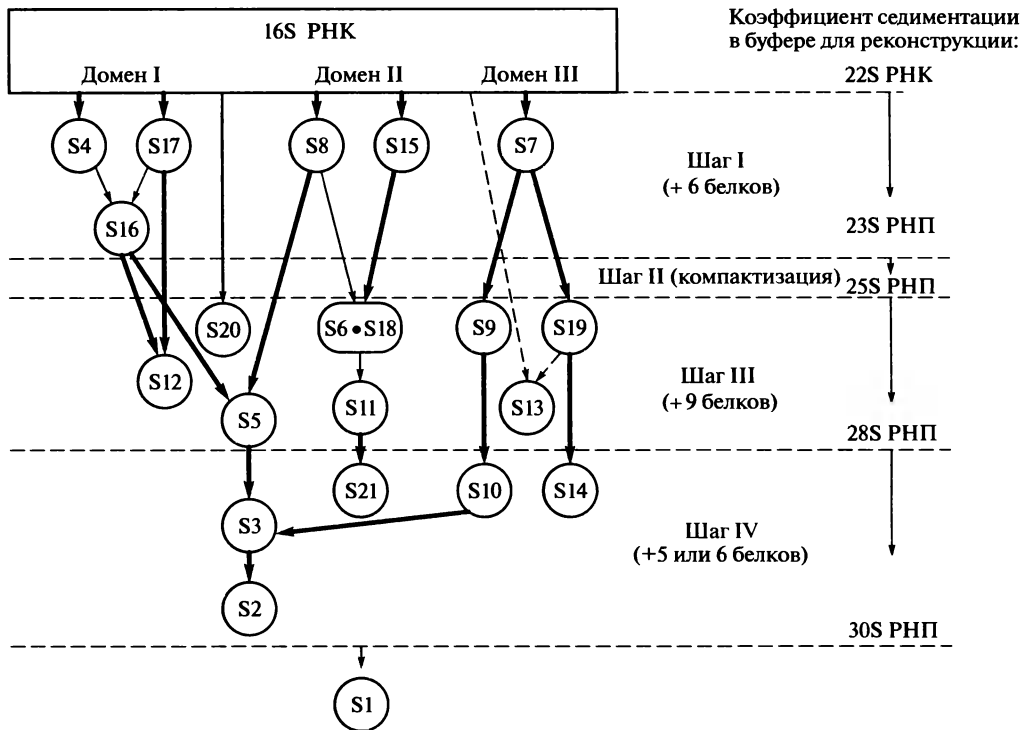


Рис. 7.7. Схема самосборки («карта сборки») 30S рибосомной субъединицы из 16S рРНК и 21 рибосомного белка.

Толстыми стрелками от РНК к белку или от белка к другому белку обозначена сильная зависимость связывания последующего партнера от предыдущего, тонкими стрелками — более слабая зависимость, пунктирными — совсем слабая или сомнительная. В целях ясности некоторые слабые взаимодействия опущены.

Held et al. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**: 3130—3111. Mizushima and Nomura (1990) *Nature* **226**: 1214—1218

являются необходимыми для перехода в более компактное состояние и могут связываться с комплексом после этого перехода. Более того, как указано на рисунке стрелками, связывание большинства белков на этой стадии самосборки зависит от присутствия набора предварительно связанных белков. Например, связывание белков S9 и S19 требует, чтобы с РНК был связан белок S7. Присоединение белков S6•S18 зависит от присутствия белка S15 и, в меньшей степени, белка S8. Связывание белка S11 требует присутствия белков S6•S18. Присоединение белка S5 индуцируется белками S8 и S16. (Необходимо подчеркнуть еще раз, что стадии II и III, показанные на схеме, не строго последовательны, а, по-видимому, проходят одновременно. Другими словами, стадии компактизации и связывания девяти белков не сильно зависят друг от друга и могут проходить параллельно; *in vitro* стадия II может осуществляться даже после завершения стадии III.)

Только после того, как рибонуклеопротеид претерпел переход в компактную конформацию, к комплексу добавляется последний набор белков, состоящий из S3, S10, S14 и S21, а также S2 и S1 (см. рис. 7.7, стадия IV); эта стадия приводит к завершенной, биологически активной 30S рибосомной субъединице. Включение каждого из этих белков в комплекс требует присутствия белков, связанных на предыдущих стадиях. Так, связывание белка S10 требует присутствия белка S9,

добавление белка S14 зависит от белка S19, белок S3 может быть включен только в том случае, если присутствуют белки S5 и S10, а связывание белка S21 стимулируется присутствием белка S11. На связывание белка S2 влияет белок S3 и, вероятно, вся локальная структура рибонуклеопротеида. Связывание самого большого кислого белка S1 также требует правильного сворачивания рибонуклеопротеида, однако трудно определить, какие специфические белки необходимы для его присоединения к частице.

Анализ полной карты реконструкции 30S субъединицы (см. рис. 7.7) показывает, что сборка каждой структурной доли частицы происходит на соответствующем домене 16S рРНК более или менее независимо. Так, белки S4, S16, S17 и S20 собираются на 5'-концевом домене 16S рРНК (I), образуя тело субъединицы. Срединный домен РНК (II) связывает белки S8, S15, S6•S18, а также белки S11 и S21 и обеспечивает сборку боковой лопасти частицы. 3'-Проксимальный домен РНК (III) с белком S7 присоединяет белки S9, S13 и S19 с последующим включением белков S10 и S14, формируя головку 30S рибосомной субъединицы. Независимость сборки структурных долей 30S субъединицы получила подтверждение в экспериментах: было показано, что изолированные фрагменты РНК, представляющие все три домена 16S рРНК, образуют компактные рибонуклеопротеидные частицы с соответствующими специфическими наборами рибосомных белков (см. Спирин и др., 1999). Специфическая сборка *in vitro* фрагментов 30S субъединицы, эквивалентных или подобных основным структурным долям полной рибосомной частицы, подтверждает общую идею о крупноблочной организации рибосом.

Междоменные взаимодействия и белковые связки между основными долями рибосомных частиц также заслуживают внимания в контексте самосборки. Наиболее характерные случаи — присоединение белка S5, которое зависит одновременно от доменов I и II 16S рРНК с содержащимися в них белками, и связывание белка S3, зависящее от всех трех доменов РНК и их соответствующих белков (см. рис. 7.7). Такая зависимость находит объяснение в том, что белки S5 и S3 действительно имеют междоменную локализацию в 30S рибосомной субъединице (см. подразд. 7.5).

На основе имеющихся к настоящему времени экспериментальных данных может быть проведен подобный анализ сборки 50S рибосомной субъединицы *E. coli* из 23S рРНК, 5S РНК и 34 белков для выявления взаимозависимостей связывания различных белков с РНК и промежуточными рибонуклеопротеидами, а также для установления последовательности стадий связывания. Имеются все основания полагать, что сборка рибосом *in vivo* происходит в основном по тому же пути, который осуществляется в процессе их реконструкции *in vitro*.

7.7. Периферическая локализация белков и их топография

7.7.1. Белковая периферия и ядро РНК

Как было показано много лет назад, протяженные области рРНК в рибосоме экспонированы в окружающую среду и доступны для действия различных внешних агентов, таких, например, как нуклеазы. Это фундаментальное отличие от вирусных частиц вполне объяснимо, поскольку рибосома является функциональной структурой, в которой РНК должна активно участвовать во взаимодействиях

с внешними факторами и не используется для хранения генетической информации. В то же время белок и РНК в рибосоме не «взаимоперемешаны». Высокомолекулярная рРНК каждой рибосомной субъединицы сворачивается в компактную структуру уникальной формы (см. подразд. 6.4.3), и рибосомные белки, как правило группами (кластерами), располагаются преимущественно на периферии компактно свернутой высокомолекулярной рРНК.

Вышеуказанный принцип организации рибосом был впервые установлен в экспериментах по измерению радиусов инерции (R_g) рибосомных субъединиц. Было показано, что радиус инерции, определенный путем диффузного малоуглового рассеивания рентгеновских лучей, значительно меньше, чем ожидалось на основе размера этой субъединицы, рассчитанного из предположения, что рибосома является равномерно плотным телом (Сердюк и др., 1970, 1975). Из этого наблюдения следовало, что более электронно-плотный компонент частицы (РНК) расположен ближе к центру тяжести частицы, тогда как менее плотный компонент (белок) имеет тенденцию располагаться в среднем ближе к периферии. Более того, измерение радиусов инерции рибосомных субъединиц с использованием различных типов излучения (рентгеновских лучей, нейтронов и света) показало, что чем больше вклад белкового компонента в общее рассеивание по сравнению с РНК (относительная рассеивающая способность белка увеличивается в ряду от рентгеновских лучей к нейтронам и видимому свету), тем больше значение R_g частицы.

Эксперименты по рассеиванию нейтронов рибосомными частицами в растворителях с различной рассеивающей способностью, а именно с различными пропорциями H_2O и D_2O , позволили прямо измерить радиусы инерции отдельно для рРНК и тотального белкового компонентов *in situ* (Штурманн и др., 1976; см. также обзор: Vasiliev, V. D., et al., 1986). Основой для подобных экспериментов является тот факт, что H_2O и D_2O значительно различаются по их способности рассеивать нейтроны, в то время как рассеивающие способности биологических макромолекул являются промежуточными между таковыми H_2O и D_2O . Поэтому можно выбрать такое соотношение между H_2O и D_2O в среде, когда значения рассеивающей способности данного типа макромолекул — белка или РНК — и растворителя равны. Это означает, что данный тип макромолекул имеет тот же контраст, что и растворитель, а следовательно, «невидим» для нейтронов. Белок рассеивает так же, как 40—42%-й D_2O , и потому «не виден» в таком растворителе, РНК «невидима» для нейтронов в 70%-м D_2O . Соответственно измерения радиусов инерции рибосомных субъединиц в 42%-м D_2O дают значения только для РНК *in situ*, а измерения в 70%-м D_2O — только для тотального белкового компонента частицы. Было обнаружено, что в случае 50S рибосомных субъединиц *E. coli* эти значения равны 65 Å для РНК и 100 Å для белка. Это означало, что рРНК тяготеет преимущественно к центру, а белок в среднем занимает более периферическое положение. В случае 30S рибосомной субъединицы различия в значениях радиусов инерции для рРНК и тотального белка частицы менее выражены — 65 Å для РНК и 80 Å для белка. Меньшая разница значений радиуса инерции и сравнительно большая его величина для РНК понятны, поскольку 16S рРНК, несмотря на ее меньшую массу, имеет менее компактную форму, т. е. является менее изометричной, чем 23S рРНК 50S рибосомной субъединицы.

Таким образом, именно после проведения вышеописанных экспериментов в 1970—1976 г. стало возможным утверждать, что компактно свернутая высокомолекулярная рРНК — 16S или 23S — образует ядро соответствующей рибосом-

ной частицы — 30S или 50S субъединицы, а рибосомные белки расположены преимущественно на периферии этого ядра. В то же время ряд данных указывал, что рибосомные белки не распределены равномерно на поверхности компактно свернутой рибосомной рРНК и тем более не покрывают поверхность РНК сплошным слоем — их просто недостаточно для этого. Позднее выяснилось, что рибосомные белки располагаются на РНК как бы пятнами, т.е. сгруппированы в кластеры, оставляя значительную часть поверхности рРНК открытой (см. подразд. 7.7.4).

7.7.2. Идентификация соседствующих белков

Выявление распределения белков на поверхности частицы, или определение *белковой топографии*, стало следующей стадией в исследованиях, конечной целью которых было установление четвертичной структуры рибосомы. Для изучения белковой топографии было создано множество экспериментальных подходов. Некоторая информация о белках, которые располагаются рядом друг с другом, была получена уже из данных по взаимодействию белков с участками рРНК. Действительно, если белоксвязывающие участки на рРНК расположены близко друг к другу, очевидно, что эти белки в рибосоме соседствуют. Например, давно было выяснено, что белки S8 и S15 узнают и связывают соседние участки цепи и соседние шпильки вторичной структуры 16S рРНК; таким образом, можно было заключить, что белки S8 и S15 также соседствуют в топографическом смысле. Однако информация такого рода была довольно ограниченной до конца 1990-х гг.

Одним из наиболее широко используемых подходов был метод химического сшивания соседних белков на рибосомной частице с последующим выделением сшитых пар и электрофоретической и/или иммунологической идентификацией белков, их составляющих. Для этой цели применялись прежде всего бифункциональные химические реагенты, которые способны ковалентно сшивать соседние белки друг с другом (см. обзор: [Traut, R. R., et al., 1980](#)). В качестве бифункциональных сшивающих агентов широко использовались диимидоэфирные углеводородные цепями различной длины. Их эфирные группы эффективно атакуются ϵ -аминогруппами остатков лизина рибосомных белков, что приводит к образованию амидиновых связей вместо эфирных. Использование реагентов различной длины, например диметилсуберимидата ($n = 6$) или диметиладипимидата ($n = 4$), позволяло грубо оценивать расстояние между соседними белками. Информация о некоторых наиболее надежных результатах ковалентного сшивания белков в 30S субъединице *E. coli* схематично представлена на рис. 7.8.

Проблема установления взаимного расположения белков в рибосоме решалась также путем определения расстояний между белками физическими методами. Наиболее информативным был подход, основанный на использовании метода рассеивания нейтронов рибосомными

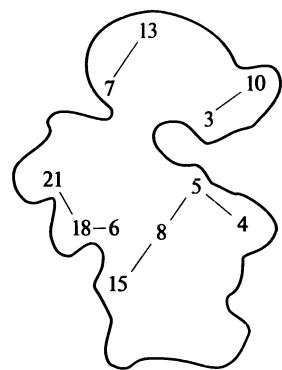


Рис. 7.8. Контур 30S рибосомной субъединицы с положениями некоторых ковалентно сшиваемых белков.

Номера надежно сшиваемых белков соединены линиями

частицами, содержащими избирательно дейтерированные белки. Поскольку для протонированных (H-содержащих) и дейтерированных (D-содержащих) белков характерно различное рассеивание нейтронов, сравнение рассеивания исходных и D-содержащих рибосомных частиц позволяет различить вклад именно дейтерированных белков. Введя два различных дейтерированных белка в рибосомную частицу путем ее реконструкции *in vitro*, можно избирательно увидеть их вклад в рассеивание нейтронов и использовать полученные данные для оценки расстояния между центрами масс этих двух белков в составе рибосомной частицы. Получив данные по расстояниям между центрами масс в различных парах белков, можно далее применить геодезический метод триангуляции для построения трехмерной модели взаимного пространственного расположения белков рибосомной частицы. Это и было сделано Муром, Энгельманом и сотрудниками в 1975—1986 гг. для 30S субъединицы бактериальной (*E. coli*) рибосомы.

7.7.3. Иммуноэлектронно-микроскопическая идентификация белков на поверхности рибосомных субъединиц

Описанные ранее подходы давали информацию о расположении белков относительно друг друга, но без соотношения с морфологией рибосомных частиц. Лишь использование электронной микроскопии для визуализации белков на рибосоме могло дать возможность определить их расположение в морфологически видимом контуре рибосомной частицы. Электронно-микроскопическая визуализация белков на рибосоме была осуществлена путем использования специфических антител против индивидуальных рибосомных белков (Вабль, 1974; Лейк и др., 1974; Штоффлер и др., 1975). Бивалентные антитела, связываясь с антигенным детерминантом на поверхности частицы, могут взаимодействовать с двумя частицами, обеспечивая их димеризацию через мостик в виде молекулы антитела (рис. 7.9). Наблюдая димеры под электронным микроскопом, можно идентифицировать участки поверхности, которые участвуют в димеризации; эти участки соответствуют расположению данного антигенного детерминанта на поверхности. В ряде случаев при достаточно большом разрешении можно непосредственно увидеть прикрепление Y-подобной молекулы антитела к определенной области поверхности частицы.

Так, с использованием описанного выше метода было впервые установлено, что белок L7/L12 формирует латеральный палочкообразный стержень («палец») 50S рибосомной субъединицы, белок L1 находится на другом латеральном выступе, а 5S РНК-белковый комплекс расположен на центральном выступе (головке) 50S субъединицы *E. coli* (рис. 7.10). Боль-

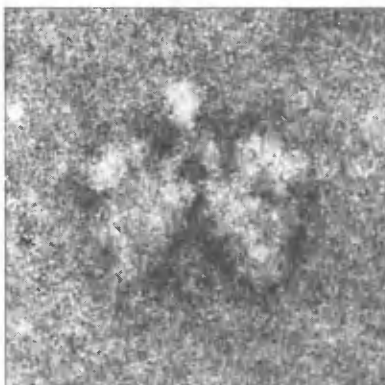
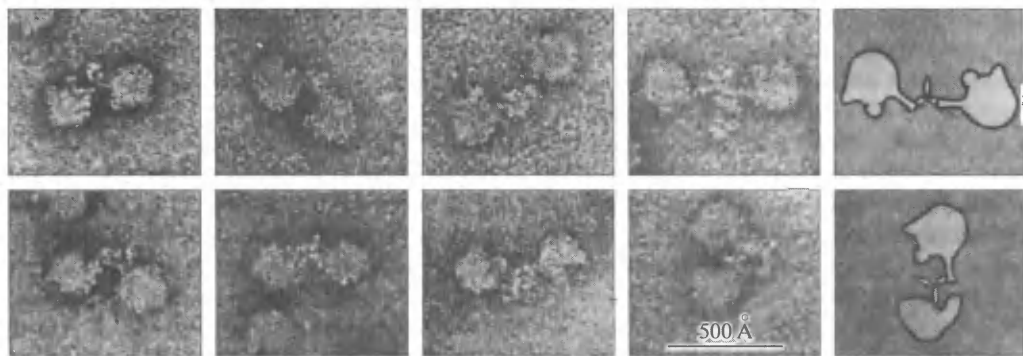


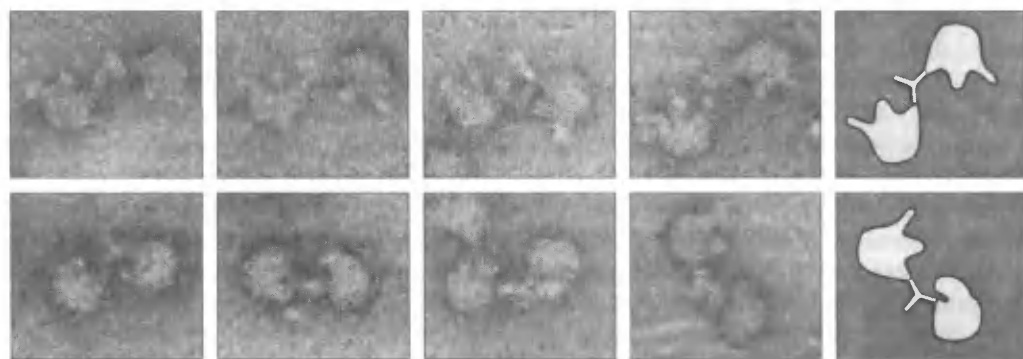
Рис. 7.9. Электронная микрофотография пары 30S рибосомных субъединиц с молекулой антитела, соединяющего гаптен-модифицированные 3'-концы их 16S рРНК.

Shatsky et al. (1979) *J. Mol. Biol.* 133: 501—515.

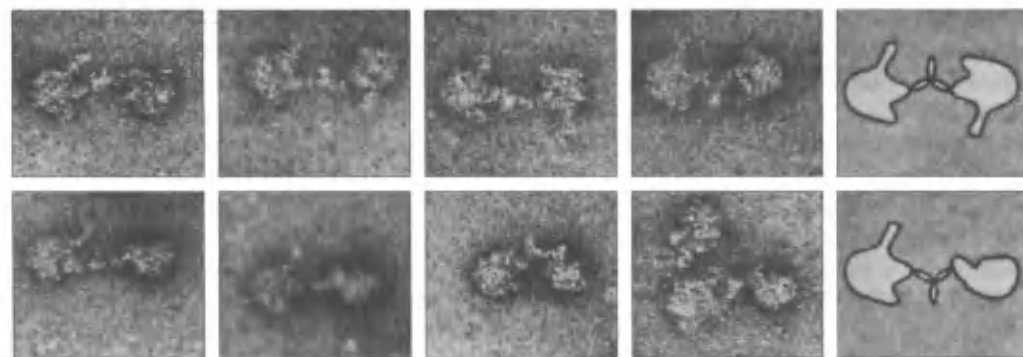
Оригинальная фотография предоставлена В. Д. Васильевым



A



B



B

Рис. 7.10. Электронная микрофотография 50S рибосомных субъединиц, прореагировавших с антителами против некоторых индивидуальных рибосомных белков.

A: антитела против белка L7/L12. Strychartz, W.A., et al. (1978) *J. Mol. Biol.* **126**: 123—140. Оригинальная фотография предоставлена Дж. Лейком.

B: антитела против белка L1. Dabbs et al. (1981) *J. Mol. Biol.* **149**: 553—578. Оригинальная фотография предоставлена Г. Штоффлером.

B: антитела против 5S РНК-белкового комплекса. Shatsky et al. (1980) *FEBS Letters* **121**: 97—100. Оригинальная фотография предоставлена В.Д. Васильевым

шие усилия были предприняты для установления мест локализации всех белков на поверхности 30S субъединицы *E. coli*. Было продемонстрировано, что белки S3, S7, S9, S10, S13, S14 и S19 расположены на головке 30S субъединицы (причем белок S3 — у самой ее «шеи», по соседству с телом), белки S6, S11, S18 и S21 — на боковой лопасти, а белки S4 и S5 — на участке тела частицы, противоположном боковой лопасти; эпитопы белков S8 и S15 были детектированы в районе боковой лопасти («платформы»).

Если результаты идентификации соседствующих белков с помощью химических сшивок и измерения расстояний между центрами масс белков методом диффузного нейтронного рассеяния имеют теперь, после определения структур рибосомных частиц с применением рентгеноструктурного анализа, лишь историческое значение, то иммуноэлектронно-микроскопическая локализация индивидуальных белков на поверхности частиц оказалась принципиально важным вкладом в познание четвертичной структуры рибосомы, так как она помогла идентифицировать белковые структуры, безымянно выявляемые при рентгеноструктурном анализе рибосомных частиц.

7.7.4. Рентгеноструктурный анализ рибосомных субъединиц

Замечательно, что 30S и 50S рибосомные субъединицы бактерий и архей, а также полные 70S рибосомные частицы оказалось возможным закристаллизовать, и это открыло путь к прямому, независимому от других — косвенных — методу определения полной четвертичной структуры прокариотических рибосом на уровне атомного разрешения. Первые совершенные кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа высокого разрешения, были получены в 1987—1989 гг. для 30S субъединиц и полных 70S рибосом термофильной граммотрицательной эубактерии *Thermus thermophilus* (Траханов и др., 1987, 1989; Юсупов и др., 1988; см. также обзор: Yusupov, M. M., Garber, M. B., et al., 1991) и в 1991 г. — для 50S субъединиц галофильной археобактерии *Haloarcula marismortui* (Йонат и др., 1991). Эти типы кристаллов были в дальнейшем использованы для получения данных по трехмерной структуре бактериальной 30S субъединицы с разрешением до 3 Å (Рамакришнан с сотр., 2000; Йонат с сотр., 2000) и археобактериальной 50S субъединицы с разрешением до 2,4 Å (Стайц с сотр., 2000). Вскоре за этим 50S субъединицы из мезофильной эубактерии *Deinococcus radiodurans* также были закристаллизованы и их структура определена с разрешением 3,1 Å (Йонат с сотр., 2001). Использование вышеупомянутых кристаллов 70S рибосом *Thermus thermophilus* и полученных на них данных по диффракции рентгеновских лучей при разрешении до 5,5 Å в сочетании с опубликованными результатами по структуре 30S и 50S субъединиц позволило впервые представить структуру полной бактериальной 70S рибосомы с размещением рибосомных белков на поверхности ее компактно свернутых молекул РНК (Ноллер с сотр., 1999, 2001). После этого структура 70S рибосомы *Thermus thermophilus* в комплексе с функциональными лигандами (мРНК и тРНК) была прямо решена с помощью рентгеноструктурного анализа при разрешении 3,7 Å (Ноллер и др., 2006) и 2,8 Å (Рамакришнан и др., 2006). Важным событием было определение с помощью рентгеноструктурного анализа структуры 70S рибосомы *Escherichia coli* с разрешением 3,5 Å (Кейт с сотр., 2005).

На рис. 7.1 цв. вкл. приведены модели четвертичной структуры обеих субъединиц бактериальной (*E. coli*) рибосомы, обращенные к читателю их контакти-

рующими (т. е. обращенными друг к другу в полной 70S рибосоме) сторонами. На рис. 7.11 вкл. представлена модель 30S (**A**, **B**) и 50S (**B**, **Г**) рибосомных субъединиц с обеих сторон — контактирующей (**A**, **B**) и внешней (**B**, **Г**); РНК и белки показаны в виде очертаний их поверхностей. Видно, что как на малой (30S), так и на большой (50S) рибосомной субъединице белки расположены преимущественно на их внешних сторонах и по краям внутренних сторон, оставляя большую часть центральной контактирующей зоны свободной от белков. Это согласуется с данными, свидетельствующими, что ассоциация субъединиц в полную рибосому обеспечивается главным образом контактами между участками РНК обеих субъединиц.

Действительно, как следует из результатов рентгеноструктурного анализа, основной постоянный контакт между субъединицами создается взаимодействием самой длинной спирали 30S субъединицы — h44, проходящей через все тело частицы от головки до «хвоста», с последовательным рядом спиральных участков 23S рРНК (H69, H71, H62) в центральной части на контактирующей поверхности 50S субъединицы. Другой контакт осуществляется между РНК боковой лопасти («платформы») 30S субъединицы (спираль h23) и спиралью (H68) домена IV 23S РНК, но этот контакт, по-видимому, не постоянен и разрывается на определенных этапах функционирования рибосомы. Постоянным контактом между боковой лопастью 30S субъединицы и доменом II 23S РНК является взаимодействие спирали H34 этого домена и белком S15. Существует и чисто белок-белковый контакт между субъединицами — лабильное взаимодействие между парой белков S13•S19 на верхушке головки 30S субъединицы, с одной стороны, и белком L5 на верхушке головки (центрального выступа) 50S субъединицы, с другой. Этот контакт непостоянен и зависит от функционального состояния рибосомы.

Рисунок 7.11 демонстрирует расположение белков 30S рибосомной субъединицы — от S2 до S21 — на поверхности частицы в четырех различных проекциях. Можно отметить три наиболее явные черты, характеризующие расположение рибосомных белков. Во-первых, как отмечалось ранее на основании более косвенных данных, большинство из них расположено группами (кластерами), а значительные участки поверхности РНК рибосомной частицы остаются свободными. Так, на внешней стороне (см. рис. 7.11, **A**) можно выделить тесные группы S10—S14—S3 и S4—S5—S8. На ребре боковой лопасти («платформы») (см. рис. 7.11, **B**) бросается в глаза сплошная белковая полоса S11—S18—S6—S15—S17. На контактирующую поверхность 30S рибосомной субъединицы (рис. 7.11, **B**) заходит группа белков S7—S13—S19 верхушки головки. Во-вторых, что тоже отмечалось ранее, контактирующая сторона субъединицы не покрыта белками, если не считать присутствия одиночного белка S12, в противоположность внешней стороне, обильно покрытой белками (ср. рис. 7.11, **A** и **B**). Все белки, видимые на контактирующей стороне частицы, кроме белка S12, локализуются по периметру поверхности. В-третьих, рентгеноструктурный анализ полностью подтвердил факт преимущественно периферийного расположения белков на компактном ядре РНК.

На большой (50S) рибосомной субъединице преобладающая часть белков тоже находится либо на внешней стороне частицы, либо на периферии поверхности, обращенной к малой субъединице, но не в центральной части контактирующей поверхности. На модели 50S рибосомной субъединицы, представленной на рис. 7.12, показана контактирующая сторона частицы. Три периферических выступа большой субъединицы — левый (если смотреть со стороны малой субъединицы), центральный и правый палочкообразный («палец») — несут на себе

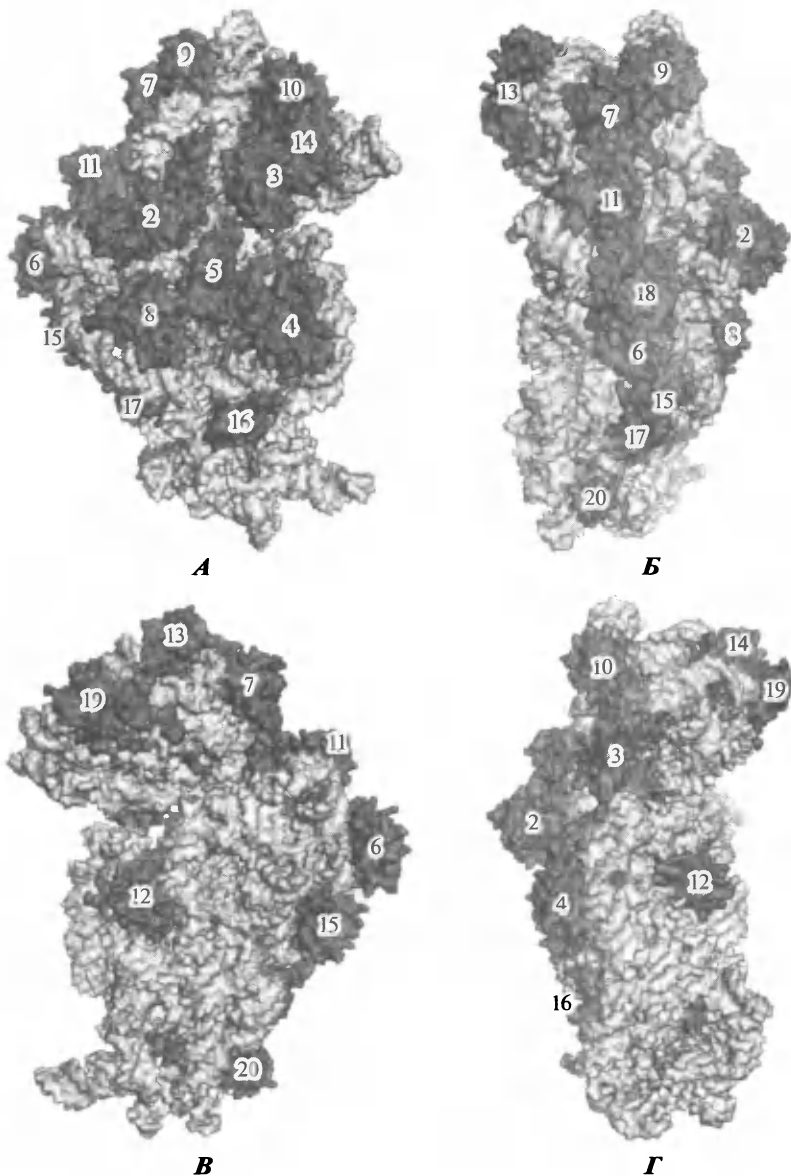


Рис. 7.11. Расположение белков 30S рибосомной субъединицы *Escherichia coli* — от S2 до S21 — на поверхности частицы в четырех различных проекциях по данным рентгеноструктурного анализа.

A: внешняя сторона, обращенная в среду.

B: боковая сторона; к зрителю обращена боковая лопасть частицы.

B: сторона, обращенная к 50S рибосомной субъединице (контактирующая сторона).

Г: боковая сторона; к зрителю обращены «клюв» и «плечо» частицы.

PDB ID 1VS7. Schuwirth et al. (2005) *Science* 310: 827–834

соответственно белок L1, белки L5 и L18 и кластер белков L7/L12—L10—L11—L6, но оба боковых выступа из-за высокой подвижности этих модулей не выявляются должным образом на рентгенограммах и потому на представленной модели

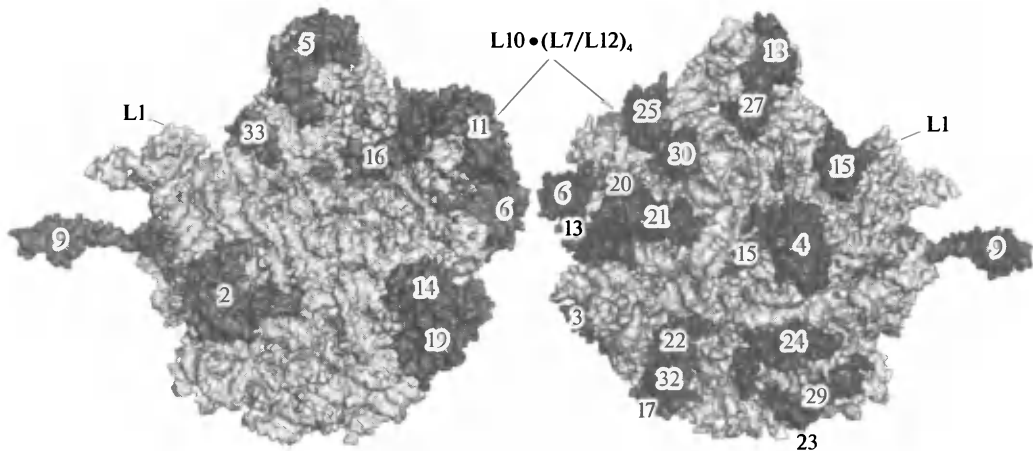


Рис. 7.12. Расположение белков 50S рибосомной субъединицы *Escherichia coli* на контактирующей (обращенной к 30S субъединице) поверхности (слева) и внешней поверхности (справа) частицы по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 1VS6. Schuwirth et al. (2005) *Science* 310: 827–834

редуцированы. На самой контактирующей поверхности большой субъединицы, т. е. между субъединицами, выявляются лишь белок L2 у края с боковым L1-выступом и 5S-РНК-связывающий белок L5 центрального выступа. Примыкают к контактирующей поверхности со стороны L7/L12-пальца «верхний» кластер L25—L16 и «нижний» кластер L3—L14—L19.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 7

- Agalarov, S. C., Selivanova, O. M., Zheleznyakova, E. N., Zheleznyaya, L. A., Matvienko, N. I., and Spirin, A. S. (1999). Independent *in vitro* assembly of all three major morphological parts of the 30S ribosomal subunit of *Thermus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 266: 533—537.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905—920.
- Bocharov, E. V., Gudkov, A. T., and Arseniev, A. S. (1996). Topology of the secondary structure elements of ribosomal protein L7/L12 from *E. coli* in solution. *FEBS Letters* 379: 291—294.
- Bocharov, E. V., Sobol, A. G., Pavlov, K. V., Korzhnev, D. M., Jaravine, V. A., Gudkov, A. T., and Arseniev, A. S. (2004). From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J. Biol. Chem.* 279: 17697—17706.
- Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N., and Noller, H. F. (1999). X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* 285: 2095—2104.
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407: 340—348.
- Diaconu, M., Kothe, U., Schleunzen, F., Fischer, N., Harms, J. M., Tonevitsky, A. G., Stark, H., Rodnina, M. V., and Wahl, M. C. (2005). Structural basis for the function of the ribosomal L7/L12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* 121: 991—1004.
- Engelman, D. M., Moore, P. B., and Schoenborn, B. P. (1975). Neutron scattering measurements of separation and shape of proteins in 30S ribosomal subunits of *Es-*

- Nomura, M., and Erdmann, V. (1970). Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. *Nature* **228**: 744–748.
- Harms, J., Schlunzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**: 679–688.
- Hosokawa, K., Fujimura, R., and Nomura, M. (1966). Reconstitution of functioning active ribosomes from inactive subparticles and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**: 198–204.
- Itoh, T., Otaka, E., and Osawa, S. (1968). Release of ribosomal proteins from *Escherichia coli* ribosomes with high concentrations of lithium chloride. *J. Mol. Biol.* **33**: 109–122.
- Kaltschmidt, E., and Wittmann, H. G. (1970). Ribosomal proteins. XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *E. coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **67**: 1276–1282.
- Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., and Noller, H.F. (2006). Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* **126**: 1065–1077.
- Lake, J.A., Pendergast, M., Kahan, L., and Nomura, M. (1974). Localization of *Escherichia coli* ribosomal proteins S4 and S14 by electron microscopy of antibody-labelled subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 4688–4692.
- Leijonmarck, M., Eriksson, S., and Liljas, A. (1980). Crystal structure of a ribosomal component at 2.6 Å resolution. *Nature* **286**: 824–826.
- Lerman, M.I., Spirin, A.S., Gavrilova, L. P., and Golov, V. F. (1966). Studies on the structure of ribosomes. II. Stepwise dissociation of protein from ribosomes by caesium chloride and the re-assembly of ribosome-like particles. *J. Mol. Biol.* **15**: 268–281.
- Mizushima, S., and Nomura, M. (1970). Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature* **226**: 1214–1218.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920–930.
- Nomura, M., and Erdmann, V. (1970). Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. *Nature* **228**: 744–748.
- Schlunzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Glühmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., and Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**: 615–623.
- Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., and Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase center in eubacteria. *Nature* **413**: 814–8821.
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M., and Cate, J.H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**: 827–834.
- Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy IV, F.V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A.C., Weir, J.R., Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**: 1935–1942.
- Serdyuk, I.N., and Grenader, A.K. (1975). Joint use of light, X-ray and neutron scattering for investigation of RNA and protein mutual distribution within the 50S particle of *E. coli* ribosomes. *FEBS Lett.* **59**: 133–136.
- Serdyuk, I.N., Smirnov, N.L., Ptitsyn, O.B. and Fedorov, B.A. (1970). On the presence of a dense internal region in the 50S subparticle of the *E. coli* ribosomes. *FEBS Letters* **2**: 324–326.
- Serdyuk, I.N., Zaccai, G., and Spirin, A.S. (1978). Globular conformation of some ribosomal proteins in solution. *FEBS Letters* **94**: 349–352.
- Spirin, A.S., Belitsina, N.V., and Lerman, M.I. (1965). Use of formaldehyde fixation for studies of ribonucleoprotein particles by caesium chloride density-gradient centrifugation. *J. Mol. Biol.* **14**: 611–615.
- Spirin, A.S., and Belitsina, N.V. (1966). Biological activity of the re-assembled ribosome-like particles. *J. Mol. Biol.* **15**: 282–283.

- StaeHELIN, T., and Meselson, M. (1966). *In vitro* recovery of ribosomes and of synthetic activity from synthetically inactive ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* **16**: 245—249.
- Stuhrmann, H. B., Haas, J., Ibel, K., De Wolf, B., Koch, M. H. J., Parfait, R., and Crichton, R. R. (1976). New low resolution model for 50S subunit of *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2379—2383.
- Tischendorf, G. W., Zeichhardt, H., and Stoeffler, G. (1975). Architecture of the *Escherichia coli* ribosome as determined by immune electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4820—4824.
- Trakhanov, S. D., Yusupov, M. M., Agalarov, S. Ch., Garber, M. B., Ryazantsev, S. N., Tishchenko, S. V., and Shirokov, V. A. (1987). Crystallization of 70S ribosomes and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters* **220**: 319—322.
- Trakhanov, S., Yusupov, M., Shirokov, V., Garber, M., Mitschler, A., Ruff, M., Thierry, J.-C., and Moras, D. (1989). Preliminary X-ray investigation of 70S ribosome crystals from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.* **209**: 327—328.
- Traub, P., and Nomura, M. (1968). Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**: 777—784.
- Von Böhlen, K., Makowski, I., Hansen, H. A., Bartels, H., Berkovitch-Yellin, Z., Zaytzev-Bashan, A., Meyer, S., Paulke, C., Franceschi, F., and Yonath, A. (1991). Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting to 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **222**: 11—15.
- Waller, J.-P. (1964). Fractionation of the ribosomal protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **10**: 319—336.
- Waller, J.-P., and Harris, J. I. (1961). Studies on the composition of the proteins from *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**: 18—23.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornheine, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327—339.
- Yusupov, M. M., Tischenko, S. V., Trakhanov, S. D., Ryazantsev, S. N., and Garber, M. B. (1988). A new crystalline form of 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters* **238**: 113—115.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Zh., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**: 883—896.
- Wabl, M. R. (1974). Electron microscopic localization of two proteins on the surface of the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli* using specific antibody markers. *J. Mol. Biol.* **84**: 241—247.

Обзоры и сборники

- Гудков, А. Т. (1999). Белок L7/L12 и факторы элонгации. Структурный и функциональный аспекты. *Успехи биологической химии* **39**: 29—44.
- Никонов, С. В., и Невская, Н. А. (1997). Пространственные структуры бактериальных рибосомных белков. *Успехи биологической химии* **37**: 101—113.
- Moore, P. B., Capel, M., Kjeldgaard, M., and Engelman, D. M. (1986). A 19 protein map of the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. In *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (eds. Hardesty, B., and Kramer, G.), pp. 87—100. Springer-Verlag, New York.
- Traut, R. R., Lambert, J. M., Boileau, G., and Kenny, J. W. (1980). Protein topography of *Escherichia coli* ribosomal subunits as inferred from protein crosslinking. In *Ribosomes: Structure, Functions, and Genetics* (eds. Chambliss, G., Craven, G. R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., and Nomura, M.), pp. 89—110. University Park Press, Baltimore.
- Vasiliev, V. D., Gudkov, A. T., Serdyuk, I. N., and Spirin, A. S. (1986). Self-organization of ribosomal RNA. In *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (eds. Hardesty, B., and Kramer, G.), pp. 128—142. Springer-Verlag, New York.

Wittmann-Liebold, B. (1984). Primary structure of *Escherichia coli* ribosomal proteins. *Adv. Protein Chem.* **36**: 56—78.

Wool, I. G., Chan, Y.-L., & Glück, A. (1996). Mammalian ribosomes: The structure and the evolution of the proteins. In: *Translational Control* (eds. Hershey, J. W. B.,

Mathews, M. B., and Sonenberg, N.), pp. 685—732. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Yusupov, M. M., Garber, M. B., Vasiliev, V. D., and Spirin, A. S. (1991). *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies. *Biochimie* **73**: 887—897.

Глава 8

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АКТИВНОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ УЧАСТКИ РИБОСОМЫ

8.1. Рабочий цикл рибосомы

Знание четвертичных структур обеих субъединиц и полной рибосомы позволяет очертить их точные контуры, а многочисленные эксперименты по локализации функциональных участков, и в первую очередь данные электронно-микроскопических и рентгеноструктурных исследований рибосом со связанными функциональными лигандами, выявляют назначение многих морфологических особенностей рибосомных частиц. На рис. 8.1 представлены контуры прокариотической рибосомы в двух проекциях — перекрывающейся и боковой, указаны взаимное расположение рибосомных субъединиц, основные морфологические домены (доли) субъединиц и внутририбосомный межсубъединичный канал, образуемый «межшейным» пространством. Канал служит для прохождения цепи мРНК во время трансляции. Он является частью более обширного межсубъединичного пространства, в котором размещаются молекулы тРНК. Поверхность 50S субъединицы у основания L7/L12-стержня служит «посадочной площадкой» для белковых факторов трансляции. Цепь мРНК и молекулы тРНК входят в канал со

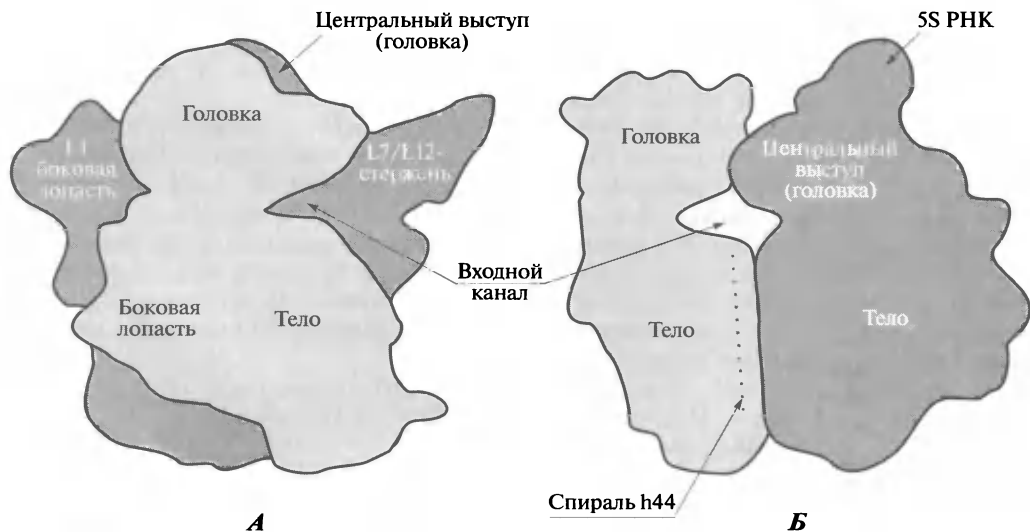


Рис. 8.1. Контуры прокариотической рибосомы в двух проекциях — перекрывающейся (А) и боковой (Б).

Светло-серым показана малая (30S) субъединица, темно-серым — большая (50S) субъединица

стороны этой площадки под «ключом» 30S субъединицы, а выходит со стороны боковой лопасти 30S субъединицы и L1-лопасти 50S субъединицы.

На рис. 8.2 представлена схема «разъязтой» транслирующей рибосомы, через «шею» малой субъединицы которой проходит мРНК с «висящими» на ее смежных кодонах двумя молекулами тРНК: одна (в положении *P*) — удерживающая на своем 3'-конце растущий полипептид (не показан), другая (в положении *A*) — приносящая в рибосому новый аминокислотный остаток (тоже не показан). Если обе субъединицы свести вместе (объединить, как в транслирующей рибосоме), то висящие 3'-концы молекул тРНК окажутся во впадине большой рибосомной субъединицы у основания центрального выступа, а конкретно — в пептидилтрансферном центре (ПТЦ), катализирующем образование пептидной связи в реакции транспептидации между молекулами пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК (см. далее).

Схема на рис. 8.3 показывает в общих чертах, как работает рибосома в процессе трансляции мРНК и элонгации полипептида. На протяжении всего процесса рибосома связана с кодирующей областью мРНК и удерживает молекулу пептидил-тРНК (см. рис. 8.3, вверху). Пептидил-тРНК представляет собой растущую полипептидную цепь, связанную через С-конец с молекулой тРНК, которая принесла последний аминокислотный остаток растущему пептиду. Такая рибосома может связать аминоацил-тРНК, соответствующую следующему кодону мРНК (см. рис. 8.3, 1). Связывание аминоацил-тРНК приводит к тому, что удерживаемая на рибосоме пептидил-тРНК и вновь связанная аминоацил-тРНК оказываются рядом на рибосоме. Их расположение бок о бок и каталитическая активность рибосомы определяют прохождение реакции *транспептидации* между ними: С-конец пептидильного остатка переносится от тРНК, с которой он был связан, на аминогруппу аминоацил-тРНК (см. рис. 8.3, 2). В результате

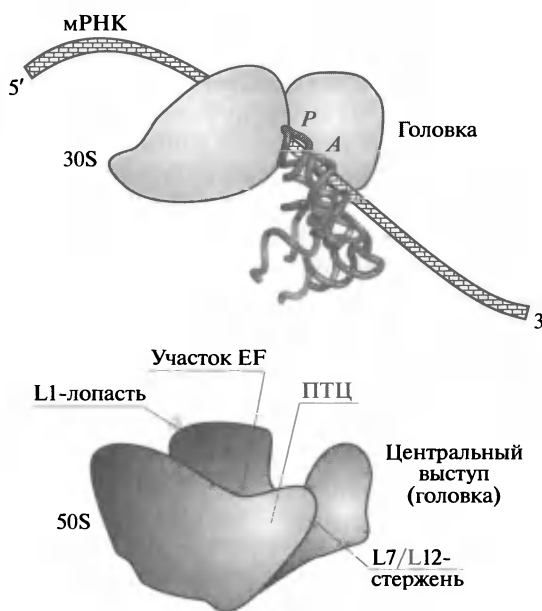


Рис. 8.2. Схема транслирующей рибосомы, разъяединенной на малую и большую субъединицы, чтобы показать локализацию основных функциональных участков

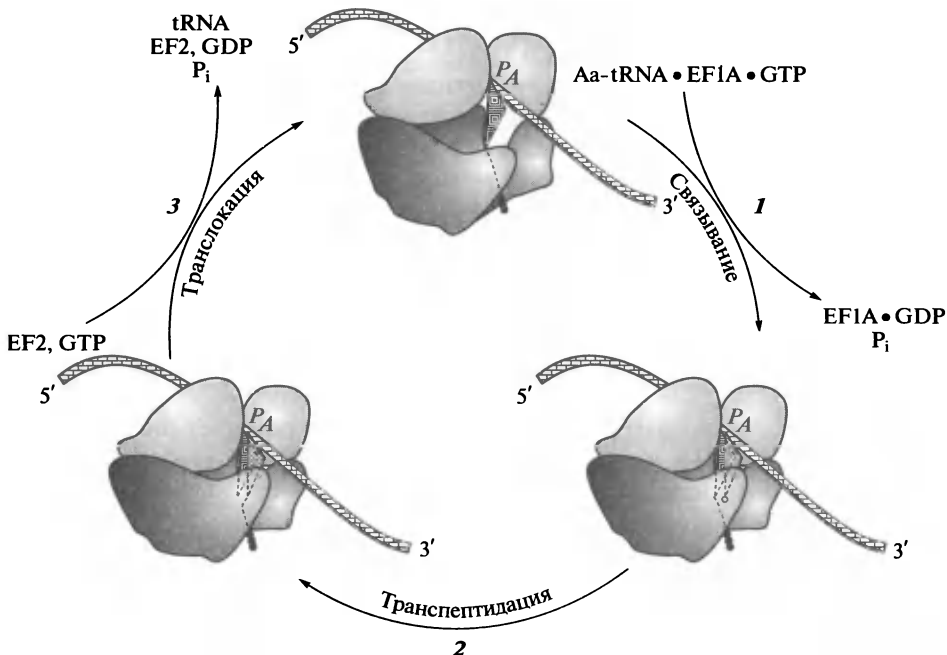


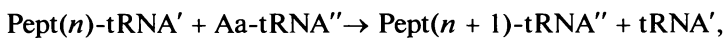
Рис. 8.3. Схема рабочего элонгационного цикла транслирующей рибосомы.

1: стадия связывания аминоксил-тРНК. 2: стадия транспептидации. 3: стадия транслокации

этого происходит формирование новой пептидил-тРНК, содержащей пептид, удлиненный на один аминокислотный остаток со стороны С-конца. Другим продуктом реакции транспептидации является деацилированная тРНК. Для того чтобы сделать рибосому способной связывать следующую аминоксил-тРНК, внутририбосомные лиганды — тРНК и мРНК — должны быть перемещены, что приводит к освобождению места для связывания очередной аминоксил-тРНК и к установке следующего кодона мРНК (см. рис. 8.3, 3); эта стадия называется *транслокацией*.

Таким образом, рабочий цикл рибосомы в процессе элонгации состоит из трех основных стадий: кондонзависимое связывание аминоксил-тРНК (стадия I), транспептидация (стадия II) и транслокация (стадия III). Связывание аминоксил-тРНК требует присутствия специального белка, называемого фактором элонгации 1 (EF1A); он также называется EF-Tu в случае прокариот и eEF-1 в случае эукариот. Связывание аминоксил-тРНК сопровождается гидролизом молекулы ГТФ. Катализ транспептидации осуществляет сама рибосома без участия каких-либо дополнительных белков. Для транслокации необходим другой белок, фактор элонгации 2 (EF2), или EF-G у прокариот и eEF-2 у эукариот, эта стадия сопровождается также гидролизом ГТФ.

Центральной химической реакцией цикла элонгации является транспептидация, в которой участвуют два субстрата — аминоксил-тРНК (Aa-tRNA'') и пептидил-тРНК (Pept(n)-tRNA')



где n и $n + 1$ — количество аминокислотных остатков в пептиде.

Участки связывания аминокислот тРНК и пептидил-тРНК на рибосоме были названы *A*- и *P*-участками соответственно. Таким образом, точное рабочее определение участков *A* и *P* заключается в том, что они представляют собой участки, занятые субстратами, реагирующими друг с другом в реакции транспептидации, катализируемой рибосомой.

Согласно классической модели (Уотсон, 1964; Липманн, 1969), на стадии I аминокислот-тРНК в комплексе с EF1A (EF-Tu или eEF-1) и ГТФ входит в рибосому и связывается с вакантным кодоном матрицы, расположенным в *A*-участке. При этом пептидил-тРНК находится в *P*-участке. Процесс связывания аминокислот-тРНК завершается гидролизом ГТФ на рибосоме и освобождением в раствор комплекса EF1A•GDP и ортофосфата. На стадии II вновь прибывшая аминокислот-тРНК, расположенная в *A*-участке, реагирует с пептидил-тРНК в *P*-участке, что приводит к переносу C-конца пептида на аминокислот-тРНК. Теперь остаток тРНК, несущий новоудлиненный пептид, занимает *A*-участок, в то время как деацилированная тРНК, образованная в результате реакции, располагается в *P*-участке. На стадии III рибосома взаимодействует с EF2 (EF-G или eEF-2) и ГТФ, и это катализирует перемещение пептидил-тРНК вместе с кодоном матрицы из *A*-участка в *P*-участок, а также освобождение деацилированной тРНК из *P*-участка. Одновременно происходит гидролиз ГТФ, а затем EF2, ГДФ и ортофосфат освобождаются из рибосомы. Таким образом, вновь возникает ситуация, когда пептидил-тРНК располагается в *P*-участке, а следующий кодон матрицы устанавливается в *A*-участке; *A*-участок теперь готов принять следующую молекулу аминокислот-тРНК. Трансляция всей кодирующей последовательности матричного полинуклеотида и соответствующая элонгация полипептида на рибосоме достигаются путем повторения таких циклов. Необходимо отметить, что процессы инициации и терминации трансляции (см. гл. 13 и 14) могут рассматриваться как модификации вышеописанного рибосомного рабочего цикла элонгации.

Схема, очерченная выше, описывает лишь наиболее принципиальные стадии цикла элонгации и опускает много промежуточных состояний. В частности, проблемы «участка входа» («прихожей»), в котором аминокислот-тРНК может временно находиться до окончательного размещения в *A*-участке, и «участка выхода», который временно принимает деацилированную тРНК после ее транслокации из *P*-участка, а также промежуточные стадии транслокации здесь не описаны и рассмотрены в подразд. 8.5.3. и 8.5.4., а также в гл. 9 и 11.

В любом случае анализ рабочего цикла рибосомы показывает, что рибосома выполняет в процессе трансляции ряд функций, включая следующие: 1) связывание и удержание мРНК, 2) удержание пептидил-тРНК, 3) связывание аминокислот-тРНК, 4) связывание белковых факторов трансляции, 5) участие в каталитическом гидролизе ГТФ, 6) катализ транспептидации, 7) комплекс внутририбосомных перемещений, известных как транслокация. За выполнение различных функций ответственны разные части рибосомы. В целом рибосома воплощает дуалистическую природу трансляции: она является декодирующей машиной, работающей с генетической информацией, и в то же время ферментом, синтезирующим полипептидную цепь. Интересно, что дуалистический принцип отражается и в двусубъединичной конструкции рибосомы — в парциальных функциях субъединиц: в то время как малая субъединица вовлечена в связывание генетического послания и его декодирование, большая субъединица полностью ответственна за пептидсинтезирующую активность.

8.2. Связывание, удержание и скользящие мРНК (мРНК-связывающий участок на малой субъединице)

Рибосомы обладают собственным сродством к матричным полирибонуклеотидам. Давно известно, что вакантные рибосомы довольно эффективно связывают полиуридилловую кислоту. Вероятно, отсутствие стабильных вторичной и третичной структур у поли(U) является важным фактором, обеспечивающим ее связывание с рибосомой.

В случае природных мРНК на матричных полирибонуклеотидах имеются определенные предпочтительные участки для связывания с вакантными рибосомами. В любом случае стабильные двойные спирали РНК не могут служить связывающими участками для вакантных рибосом.

В то же время в процессе трансляции (элонгации) рибосома проходит вдоль полной кодирующей последовательности мРНК и может временно удерживать матрицу в любой области ее нуклеотидной последовательности в развернутом состоянии. Таким образом, транслирующая рибосома расплетает матричный полинуклеотид, так что участок матрицы, удерживаемый рибосомой, лишен своих оригинальных вторичной и третичной структур. Кодон-антикодоновые взаимодействия матричного полинуклеотида с тРНК несомненно вносят вклад в удержание мРНК на транслирующей рибосоме. Однако рибосома удерживает на себе не только кодоны, связывающие тРНК, — транслирующая рибосома, связанная с матричным полинуклеотидом, защищает достаточно длинную нуклеотидную последовательность от внешних рибонуклеаз и химических модификаций. Уже ранние эксперименты с поли(U) показали, что рибосома закрывает участок длиной по крайней мере 25 нуклеотидных остатков, делая его недоступным для панкреатической рибонуклеазы (Таканами и Зьюбей, 1964). Позднее было установлено, что рибосома, связанная с природной мРНК, может защищать от нуклеаз или химических модификаций и более длинную область мРНК. Рентгеноструктурный анализ прокариотической рибосомы выявляет участок матричного полинуклеотида длиной около 30 нуклеотидных остатков, находящийся в прямой связи с рибосомной частицей (Юсупова, Ноллер и др., 2001).

Первый вопрос, который встает при исследовании мРНК-связывающего участка рибосомы, — формируется ли он исключительно на какой-либо одной из двух рибосомных субъединиц, или это функция целой рибосомы. В экспериментах с изолированными рибосомными субъединицами было показано, что бактериальная 30S субъединица связывает матричный полинуклеотид, в то время как 50S субъединица этой способностью не обладает (Таканами и Окамото, 1963). Всеми последующими работами было подтверждено, что мРНК-связывающий участок находится целиком и только на малой (30S или 40S) субъединице рибосомы. При этом изолированная малая рибосомная субъединица защищает на мРНК область той же длины, что и полная рибосома (при условии, что аминоацил-тРНК также связана с субъединицей за счет кодон-антикодонового взаимодействия). В любом случае значительная длина мРНК-связывающего участка позволяет заключить, что связывание мРНК с частицей является многоцентровым, т.е. в нем участвуют несколько связывающих точек на поверхности малой рибосомной субъединицы. Естественно, что расположение двух кодонов мРНК, взаимодействующих с антикодонами обеих молекул субстратной тРНК, т.е. *декодирующий центр* малой субъединицы, представляет особый интерес.

Для установления расположения мРНК-связывающего участка на морфологически видимых поверхностях рибосомы были выполнены изящные иммуноэлектронно-микроскопические исследования 30S субъединиц и 70S рибосом, связанных с короткой поли(U), несущей ковалентно присоединенный гаптен на 3'- или 5'-конце (Богданов, Васильев и др., 1983). Антитела против гаптенных, связанных с матричным полинуклеотидом, были обнаружены в области борозды («шеи»), отделяющей головку от остальной части 30S субъединицы. Более того, было показано, что входящий (3') и выходящий (5') концевые отрезки короткого матричного полинуклеотида у поверхности рибосомы направлены не вдоль поверхности раздела между субъединицами, а приблизительно перпендикулярно ей, и выходят на внешнюю (обращенную в противоположную от большой субъединицы) сторону. Эти данные были интерпретированы так, что мРНК входит в «шейную» борозду малой субъединицы с ее внешней (обращенной в среду) стороны и далее образует петлю вокруг «шеи» малой субъединицы, проходя по «межшейному» пространству и затем поворачивая опять на внешнюю сторону субъединицы.

Экспериментальный подход с использованием коротких химических сшивок между мРНК и рибосомной 16S рНК показал, что в области мРНК-связывающего центра рибосомы, и прежде всего ее декодирующего центра, находятся нуклеотидные остатки спиральных участков, принадлежащих всем трем основным и дополнительному 3'-концевому доменам рРНК (Мюллер и Бримакомб, 1997). Это прежде всего сама «шейная спираль» h28, соединяющая головку с остальной частью 30S субъединицы, и основание длинной составной спирали h44 — ее «верхняя» часть, непосредственно примыкающая к основному 3'-проксимальному домену 16S рРНК (см. рис. 6.1), т.е. к «шее» и головке 30S субъединицы. Кроме того, данный подход показал, что в формирование участка связывания мРНК вовлечены смежные спирали h29 и h43 «нижнего» субдомена, а также спирали h34 и h37 «верхнего» субдомена 3'-проксимального домена (головка 30S субъединицы). Интересно, что спираль h18 — ее так называемая «петля 530» — 5'-концевого домена (тело субъединицы) и спирали h20-h22 центрального домена (боковая лопасть субъединицы) тоже оказались непосредственно задействованы в контактах с мРНК. Такое междоменное расположение мРНК-связывающего участка полностью подтверждало вывод о его локализации в районе «шеи» — борозды, отделяющей головку от тела и от бокового выступа малой субъединицы. Важно подчеркнуть, что все экспериментально найденные контакты 16S рРНК с мРНК являются универсальными, эволюционно консервативными, и не зависят от последовательности мРНК. Их формирование, однако, зависит от связывания тРНК с декодирующим центром рибосомы. Таким образом, несколько высококонсервативных областей универсального ядра 16S рРНК (разбросанные в первичной и вторичной структурах рРНК, но, очевидно, собранные вместе в ее третичной структуре) образуют многоточечные контакты с мРНК, обеспечивая ее фиксацию в декодирующем центре и в то же время возможность скольжения матричной цепи вдоль этого центра в процессе трансляции.

Окончательно вопрос о локализации мРНК-связывающего участка и декодирующего центра в борозде, отделяющей головку от остальной части малой рибосомной субъединицы, был решен путем рентгеноструктурного анализа различных функциональных комплексов рибосомных частиц. Идентифицировав положения тРНК в А- и Р-участках на карте электронной плотности 70S рибосомы с разрешением 7,8 Å, а затем и 5,5 Å, Ноллер с сотрудниками (1999, 2001) показали, что

антикодоновые ветви связанных с рибосомой молекул тРНК прямо опираются в «шею» малой субъединицы — естественно, со стороны, обращенной к большой субъединице. Эти результаты были подтверждены и уточнены в работах Рамакришнана и др. (2002, 2006), использовавших изолированные антикодоновые шпильки для кодон-антикодонного связывания с кодон-программированной 30S субъединицей при разрешении около 3 Å. Данные рентгеноструктурного анализа малой (30S) рибосомной субъединицы со связанными лигандами (аналогами мРНК и тРНК) подтвердили результаты, полученные с помощью химических сшивок, свидетельствующие о том, что декодирующий центр мРНК-связывающего участка рибосомы формируется главным образом районом нуклеотидных остатков 1397—1410/1490—1505, который представляет собой основание самой длинной спирали малой субъединицы — h44. Кроме того, как следует из этих структурных данных, в формировании центра и удержании кодон-антикодонных дуплексов участвуют также несколько смежных спиралей (h28-h29-h30-h31) и спираль h34 головки, спираль h18 тела и торцевые петли спиралей h23 и h24 бокового выступа («платформы») малой субъединицы, что также согласуется с вышеприведенными химическими данными. К мРНК-связывающему участку примыкает ближайшая к 3'-концу шпилька h35; в случае бактериальных рибосом ее «хвост» в виде богатой пиримидинами 3'-концевой нуклеотидной последовательности прямо участвует в первичном связывании мРНК с рибосомой (см. гл. 14).

В специальном рентгеноструктурном исследовании локализации мРНК на малой субъединице (Юсупова, Ноллер и др., 2001) была выявлена вся траектория пути мРНК по «шейной» борозде (рис. 8.4, рис. 8.1 цв. вкл.). Прежде всего, были

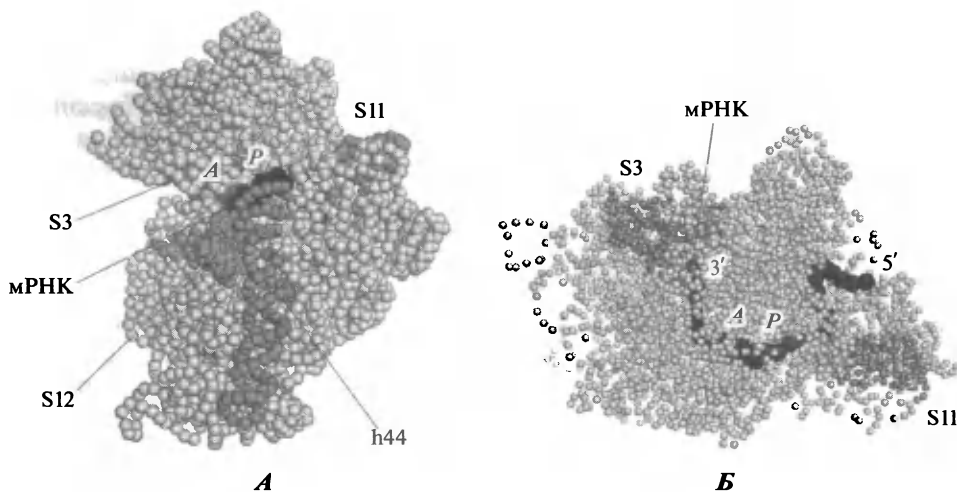


Рис. 8.4. Локализация цепи мРНК на «шее» 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

А: контактирующая (обращенная к 50S субъединице) поверхность 30S субъединицы в комплексе с короткой мРНК. С поверхности в шейной борозде виден участок мРНК с двумя кодонами, установленными в А- и Р-участках декодирующего центра; 5'- и 3'-концы мРНК уходят вдоль «шей» вглубь от зрителя, приблизительно перпендикулярно поверхности.

Б: 30S субъединица развернута своей «головкой» к зрителю и контактирующей стороной вниз, так что видны 5'- и 3'-концевые участки мРНК, поднимающиеся от контактирующей поверхности вверх; 5'-концевая часть затем поворачивает к боковой лопасти субъединицы (вправо).

PDB ID 1JGO. Yusupova et al. (2001) *Cell* 106: 233—241

полностью подтверждены данные, полученные химическими методами (использование коротких сшивок между мРНК и окружающими ее группами рибосомной субъединицы; см. ранее). Далее было показано, что к межсубъединичной поверхности обращены только кодоны, связывающие тРНК (см. рис. 8.4, **A**). Наконец, было прямо продемонстрировано, что участки мРНК, непосредственно *предшествующие* тРНК-связывающим кодоном в направлении движения транслирующей рибосомы (*downstream*), и расположенные *после* них (*upstream*), действительно направлены более или менее перпендикулярно межсубъединичной поверхности, выходя из рибосомы на ее наружную сторону (см. рис. 8.4, **B**) — в полном соответствии с приведенной ранее интерпретацией данных иммуоэлектронной микроскопии. На основании того, что тРНК, связанная в *A*-участке, а следовательно, и ее антикодон расположены у вогнутого бока, со стороны «клюва» и «плеча» малой субъединицы, а тРНК в *P*-участке — ближе к боковому выступу («платформе») малой субъединицы, можно было сделать однозначный вывод, что мРНК в процессе трансляции скользит вдоль борозды (вдоль «шеи») малой субъединицы в межсубъединичном пространстве в направлении $A \rightarrow P$ или, если рассматривать полную рибосому, от пальцеобразного выступа (L7/L12-стержня) и белка S3 к белку S11 и L1-выступу (см. рис. 8.1, **A**).

Таким образом, согласно всей совокупности имеющихся данных, протяженная мРНК-связывающая область содержит множество структурных элементов 16S рРНК, включая группу спиралей в основании главного 3'-домена совместно с примыкающей к этой группе частью длинной составной спирали (h44) минорного 3'-концевого домена и торцевыми участками спиралей центрального и 5'-концевого доменов, а также терминальную нуклеотидную последовательность 16S рРНК.

Что касается рибосомных белков, то к мРНК-связывающему участку могут примыкать белок S12 со стороны *A*-участка, т.е. «входа», и белки S7 и S11 с другой стороны борозды, т.е. «выхода» (см. рис. 7.11, **B**); кроме того, вытянутые С-концевые «хвосты» белков S9 и S13 достигают окрестностей *P*-участка в районе «шеи». Однако они, по-видимому, не принимают непосредственного участия в удержании мРНК на рибосоме и обеспечении ее скольжения вдоль мРНК-связывающего участка рибосомы. Напротив, белки S3 и S4, расположенные у входа в мРНК-связывающий канал, но с внешней стороны 30S субъединицы (см. рис. 7.11, **A**), были идентифицированы как компоненты, участвующие в расплетании вторичной структуры поступающей в канал мРНК (Ноллер и др., 2005). Остается неясной роль крупного белка S1, точное положение которого на бактериальной 30S субъединице пока не установлено, но про который известно, что он связывается с малой субъединицей (в случае бактериальных рибосом) и каким-то образом способствует вовлечению мРНК в трансляцию.

8.3. Катализ реакции образования пептидной связи (пептидилтрансферазный центр на большой субъединице)

Пептидилтрансферазная активность является основной и, по-видимому, единственной каталитической функцией самой рибосомы. Она отвечает за формирование пептидных связей во время элонгации полипептида. В транслирующей рибосоме реакция транспептидации происходит между пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК. В этой реакции пептидил-тРНК служит донорным субстратом, а аминоацил-тРНК — акцепторным субстратом (рис. 8.5).

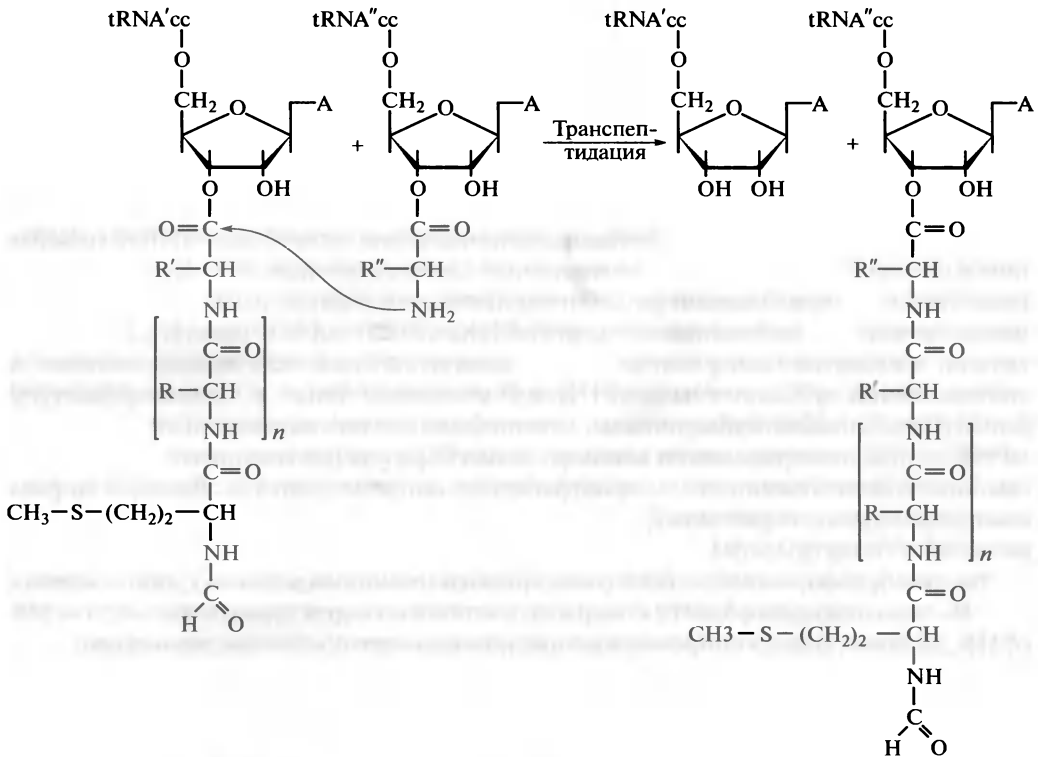
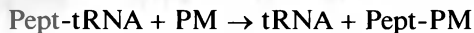


Рис. 8.5. Реакция трансепептидации, катализируемая рибосомой

Следует отметить, что рибосома может катализировать реакцию трансепептидации не только с участием этих природных субстратов. Антибиотик пуромицин (PM) может служить низкомолекулярным акцепторным субстратом реакции (Наганс, 1964; Траут и Монро, 1964). По химической природе он представляет собой аналог аминоацелированного 3'-концевого аденозина молекулы аминоацил-тРНК (рис. 8.6); его характерные черты — диметилированная аминогруппа в положении 6 остатка аденина, метилированный гидроксил остатка тирозина и амидная связь вместо сложноэфирной между рибозой и аминоацильным остатком. Добавление пуромицина к транслирующим рибосомам приводит к реакции между антибиотиком как акцепторным субстратом и пептидил-тРНК как донорным субстратом в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) рибосомы:

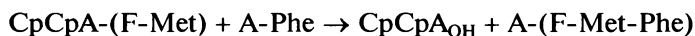


В этом случае пептид переносится не на аминоацил-тРНК, а на низкомолекулярное соединение — пуромицин, который не удерживается рибосомой. Таким образом, пуромицин приводит к прекращению роста пептида и его преждевременному (абортивному) освобождению из рибосомы.

Использование пуромицина сыграло важную роль в исследовании пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосомы. Прежде всего, уже в ранних исследованиях рибосом его использование позволило идентифицировать субъединицу рибосомы, которая несет на себе ПТЦ. Дело в том, что после диссоциации транслирующей рибосомы (70S или 80S) изолированная большая субъединица (50S или 60S) может удерживать на себе пептидил-тРНК. Более того, изолированная боль-

шая субъединица из нетранскрибирующей рибосомы демонстрирует способность к лабильному взаимодействию с экзогенной пептидил-тРНК или ее аналогами, такими как 3'-концевые фрагменты аминоксил-тРНК с замещенной (блокированной) аминогруппой. Когда пурамицин добавляется к большим рибосомным субъединицам, несущим пептидил-тРНК, или к свободным большим субъединицам в присутствии N-блокированного 3'-концевого фрагмента аминоксил-тРНК, в растворе происходит реакция транспептидации, в которой связанная пептидил-тРНК или ее растворенный аналог служат в качестве донорного субстрата (Монро, 1964). Следовательно, можно заключить, что каталитический ПТЦ располагается исключительно на большой (50S или 60S) субъединице. Малая (30S или 40S) субъединица рибосомы не участвует в катализе реакции.

Поскольку в реакции транспептидации участвуют два субстрата — донорный и акцепторный, то в пределах ПТЦ должны существовать два субстратсвязывающих центра. Они могут быть обозначены как *p*- и *a*-участки ПТЦ соответственно. Простейшим субстратом акцепторсвязывающего участка (*a*-участка) ПТЦ служит аминокислотированный аденозин, например A-Phe, A-Tyr, A-Lys, A-Met или A-Ala; пурамицин — аналог такого субстрата. Субстратом для донорсвязывающего участка (*p*-участка) ПТЦ является аминокислотированный тринуклеотид СС_А с N-блокированной аминогруппой, такой как С_pС_pА-(Ac-Aa) или С_pС_pА-(F-Aa), где Ac-Aa — N-ацетиламиноацильный остаток, а F-Aa — N-формиламиноацильный остаток, сидящие в 3'-положении концевого аденозина. Если такие аминокислотированные нуклеотиды и олигонуклеотиды, например С_pС_pА-(F-Met) и A-Phe, добавлены к изолированной большой субъединице рибосомы, то частица работает как эффективный катализатор транспептидации между двумя низкомолекулярными субстратами:



В такой реакции с низкомолекулярными субстратами ни один из продуктов не удерживается 50S субъединицей, и оба они немедленно освобождаются в раствор, что типично для большинства ферментативных реакций.

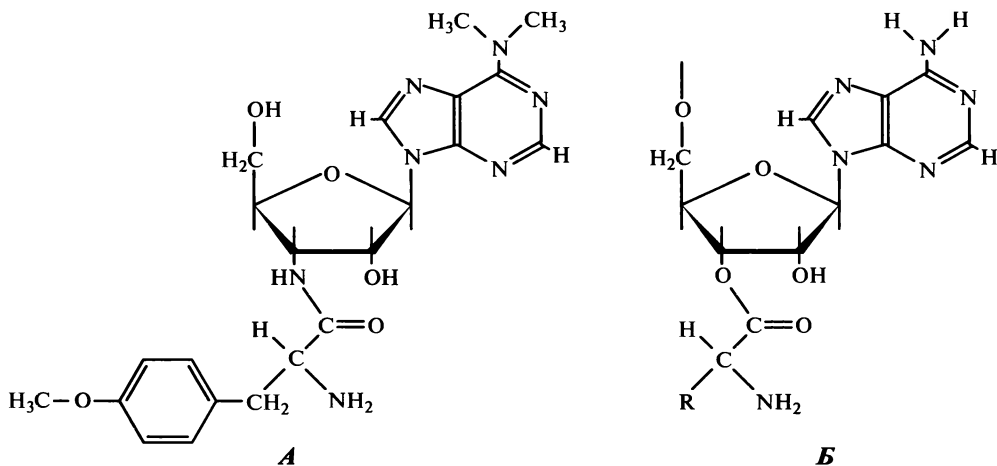


Рис. 8.6. Пурамицин (А) как аналог аминокислотированного 3'-концевого аденозина аминоксил-тРНК (Б)

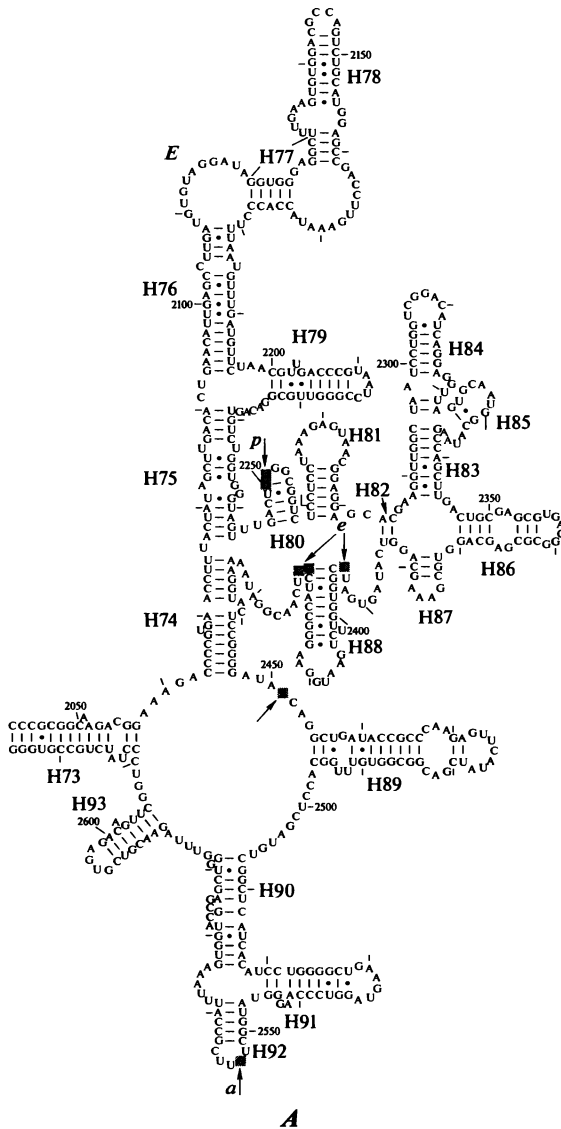
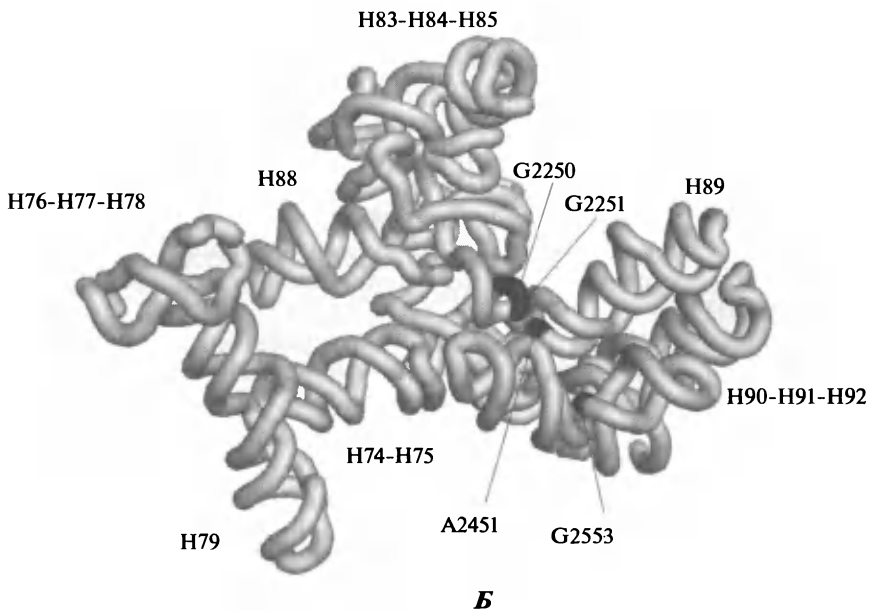


Рис. 8.7. Домен V 23S рибосомной РНК

А: схема вторичной структуры домена V с так называемым «ПТЦ-кольцом». На схеме серым фоном ПТЦ (A-петля шпильки H92, P-петля шпильки H80, A2451, играющий важную роль в катализе лирированной тРНК после транспептидации (e-участок связывания деацелированного конца тРНК

Б: схема третичной структуры домена V по данным рентгеноструктурного PDB ID 1VS6. Schuwirth et al.

При транспептидации как стадии элонгационного цикла 3'-концевой аминокислотированный аденозин молекулы аминокислот-тРНК, расположенной в А-участке, тоже связывается в а-участке ПТЦ, а 3'-концевая ССА-последовательность с аминокислотным остатком и ближайшей пептидной группой молекулы пептидил-тРНК, занимающей Р-участок, фиксируется в р-участке ПТЦ. Однако в этом случае в результате реакции транспептидации продукты реакции не



с пептидилтрансферазным центром (ПТЦ).

и стрелками указаны нуклеотидные остатки, принимающие непосредственное участие в организации транспептидации, и др.), а также остатки, участвующие в формировании участков связывания деацети- и *E*-участок, с которым взаимодействует «угол» L-образной молекулы деацилированной тРНК). анализа. Функциональные группы *α*- и *ρ*-участков ПТЦ выделены черным. (2005) *Science* **310**: 827—834

могут быть освобождены в раствор, а удерживаются рибосомой прежде всего потому, что их тРНК остаются связанными в *A*- и *P*-участках транслирующей рибосомы.

В свое время было предпринято много попыток выделить «фермент» из 50S или 60S субъединицы, что фактически было поиском рибосомного белка, ответственного за катализ транспептидации. Однако ни одна из этих попыток не была

успешной — изолированные рибосомные белки никогда не демонстрировали пептидилтрансферазной активности. В то же время эксперименты по аффинному мечению ПТЦ химически активными или фотоактивируемыми аналогами субстратов неоднократно демонстрировали, что преимущественной мишенью была 23S рРНК. Большинство сшивок аналогов субстратов в районе ПТЦ было сконцентрировано в домене V 23S рРНК (см. рис. 6.2), значительная часть которого располагается в районе центрального углубления на контактирующей стороне большой субъединицы, т. е. в «яме», или «канаве», отделяющей центральный выступ от тела, со стороны, обращенной к малой субъединице (см. рис. 5.8 и 5.9). В том же домене V 23S рРНК обнаруживались и нуклеотидные замены в случаях мутационных изменений ПТЦ. При связывании акцепторных и донорных субстратов происходила защита ряда нуклеотидных остатков в районе ПТЦ от химических модификаций кетоксалем, диметилсульфатом или карбодиимидом, и было показано, что защищаемые участки также находятся главным образом в домене V. Более того, оказалось, что и химические сшивки аналогов субстратов с ПТЦ, и защищаемые субстратами нуклеотидные остатки, и мутационные замены в ПТЦ концентрируются в пределах эволюционно консервативной части домена V — главным образом в нуклеотидной последовательности 2230 — 2620 (см. рис. 6.2). Эта область домена V, в которой соединяются пять спиралей, была обозначена как «ПТЦ-кольцо» в предположении, что она и является пептидилтрансферазным центром. Интересно, что рассматриваемая область особенно обогащена модифицированными нуклеотидными остатками. Как априорные соображения, так и экспериментальные данные о пространственной близости удаленных в первичной и вторичной структурах районов «ПТЦ-кольца» указывали на существование в этой области специфической компактной третичной структуры, формирование которой и обеспечивает ее пространственную организацию, необходимую для активности ПТЦ.

Хотя все данные говорили о том, что ПТЦ организован в основном путем самосворачивания домена V 23S рРНК, вклад ряда рибосомных белков в стабилизацию пространственной структуры пептидилтрансферазной области, а может быть и в функцию ПТЦ, нельзя было отрицать. Действительно, никому не удалось показать, что свободная от белков 23S рРНК может катализировать формирование пептидной связи. Тем не менее рентгеноструктурный анализ большой (50S) субъединицы рибосом *Haloarcula marismortui* с высоким разрешением (Стайтц и др., 2000, 2002) позволил однозначно ответить на вопрос о природе каталитической активности ПТЦ: так как никаких белковых структур в непосредственной близости от субстратсвязывающих *a*- и *p*-участков ПТЦ и реагирующих групп связанных субстратов не обнаруживается, то ПТЦ может рассматриваться как истинный рибозим. Другими словами, каталитический центр образован рибосомной 23S РНК, а более точно — ее доменом V (см. рис. 8.II цв. вкл.). Нуклеотидные остатки, непосредственно участвующие в ориентации реагирующих групп донорного и акцепторного субстратов, идентифицированы, и пространственная структура центра расшифрована. Как уже указывалось, каталитический центр включает район нуклеотидных остатков «ПТЦ-кольца» с его шпильчатыми спиральями, формирующей компактный 3'-проксимальный субдомен, а также примыкающую часть 5'-проксимального субдомена домена V; ПТЦ локализуется в месте схождения этих субдоменов (рис. 8.7 и рис. 8.II, 8.III цв. вкл.; см. также подразд. 6.2 и рис. 6.I цв. вкл.). Нуклеотидные остатки, непосредственно участвующие в связывании донорного и акцепторного субстратов ПТЦ, принадлежат

торцевым петлям так называемых *P*- (или *p*-) и *A*- (или *a*-) шпилек (шпильки H80 и H92 соответственно); их гуаниловые остатки (G2251, G2252, G2553) образуют уотсон-криковские водородные связи с цитидиловыми остатками ССА-концов тРНК донорного и акцепторного субстратов, т.е. непосредственно вовлечены в формирование *p*- и *a*-участков ПТЦ (см. рис. 8.IV цв. вкл.). Нуклеотидный остаток A2451 «ПТЦ-кольца» играет важную роль в катализе реакции транспептидации: его N-3 может образовывать одну водородную связь с аминогруппой аминоацильного остатка молекулы аминоацил-тРНК, сидящей в *A*-участке, а вторая водородная связь может образовываться между аминогруппой и либо 2'-ОН этого же нуклеотидного остатка (A2451), либо 2'-ОН концевого аденозина (A76) молекулы пептидил-тРНК, сидящей в *P*-участке. Указанные взаимодействия устанавливают акцепторную аминогруппу рядом с карбонильным углеродом сложноэфирной группы донорного субстрата в ориентации, благоприятной для нуклеофильной атаки (Стайтц и др., 2002) (см. гл. 10).

Таким образом, ПТЦ формируется доменом V рибосомной 23S РНК и расположен на контактирующей стороне большой субъединицы в области, свободной от белков, приблизительно в центре равностороннего треугольника, образуемого белками L5, L2 и L14 (см. рис. 7.12), в глубокой борозде, или «яме», разделяющей центральный выступ и основное тело большой рибосомной субъединицы, будучи прикрыт от непосредственного контакта с поверхностью малой субчастицы поперечной спиралью домена IV (см. рис. 8.II цв. вкл.).

8.4. ГТФ-зависимое связывание факторов трансляции (участок связывания белковых факторов на большой субъединице)

Элонгация сопровождается периодическим связыванием и освобождением транслирующей рибосомой белков EF1A (EF-Tu) и EF2 (EF-G), называемых факторами элонгации (см. рис. 8.3). Каждый из этих белков образует комплекс с ГТФ, и их освобождение происходит в результате гидролиза ГТФ. Цикл связывания и освобождения EF1A (EF-Tu) осуществляется во время связывания аминоацил-тРНК, а связывание и освобождение EF2 (EF-G) происходит в процессе транслокации. Подобным же образом инициация трансляции сопровождается связыванием с рибосомой белка IF2 (или eIF2 в случае эукариот) в комплексе с ГТФ и его освобождением в результате гидролиза ГТФ. Наконец, при терминации трансляции рибосома связывает и освобождает фактор терминации RF3, и ГТФ также участвует в этом процессе. Все упомянутые белки, взаимодействующие с рибосомами в форме ГТФ-комплексов, связываются с одной и той же областью рибосомной частицы. Их связывающие участки на рибосоме либо идентичны, либо, по крайней мере, значительно перекрываются. Соответственно эти белки конкурируют друг с другом за связывающие участки на рибосоме и не могут присутствовать на ней одновременно.

Поскольку все упомянутые белки легко освобождаются из рибосомы после гидролиза ГТФ, изучение их связывания *in vitro* можно проводить, если ГТФ заменить на негидролизуемый аналог, такой как гуанилилметиленидифосфонат (GMP-PCP) или гуанилилимидодифосфат (GMP-PNP) (рис. 8.8). Комплексы белков с такими аналогами хорошо взаимодействуют с рибосомой и удерживают-

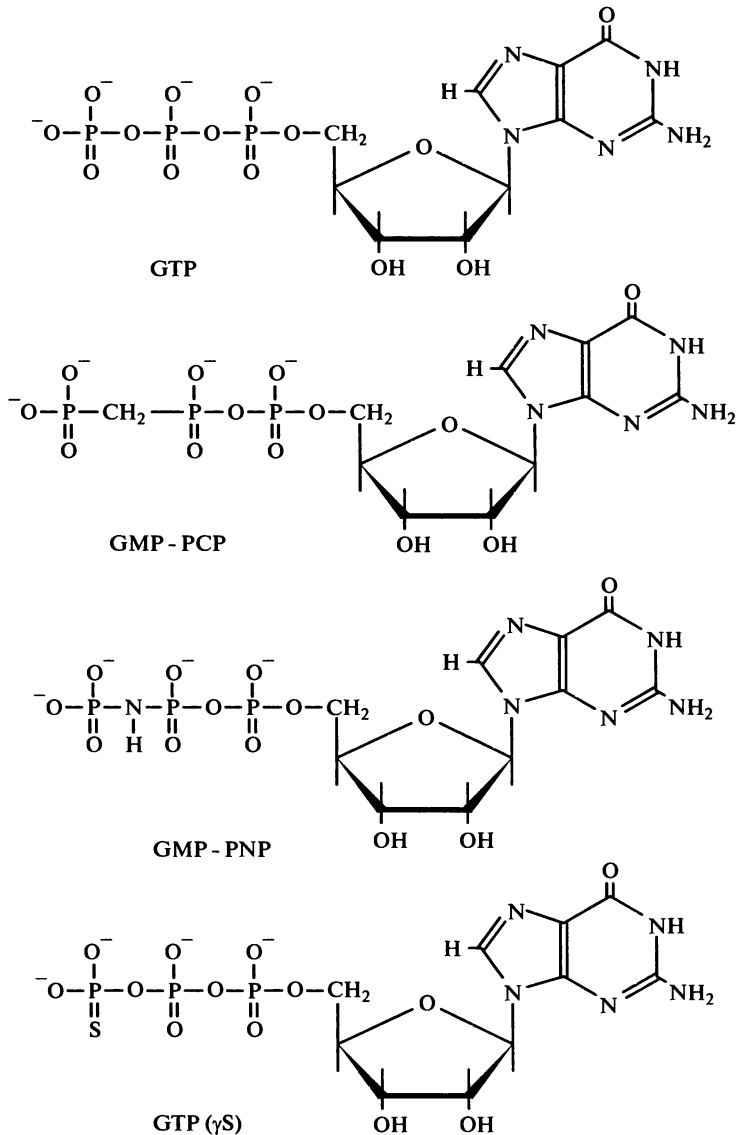


Рис. 8.8. ГТФ и его негидролизующие или медленно гидролизующие аналоги, используемые для изучения функций рибосомы и факторов трансляции:

GTP — ГТФ, гуанозин-5'-трифосфат;

GMP-PCP — негидролизующий аналог 5'-гуанилиметиленидифосфонат;

GMP-PNP — очень медленно гидролизующий аналог 5'-гуанилилимидодифосфат;

GTP(γS) — медленно гидролизующий аналог гуанозин-5'-(γ-тио)трифосфат

ся на ней. Так, белок EF-G с GMP-PCP может образовывать довольно стабильный комплекс как с транслирующей, так и с вакантной рибосомой. EF-G с GTP также взаимодействует с транслирующей и вакантной рибосомой, но комплекс не удерживается на них, поскольку ГТФ претерпевает гидролиз, и EF-G и ГДФ освобождаются из частицы. Однако в присутствии антибиотика фузидовой кислоты (см. далее, рис. 11.4) EF-G сохраняет свое сродство к рибосоме даже после

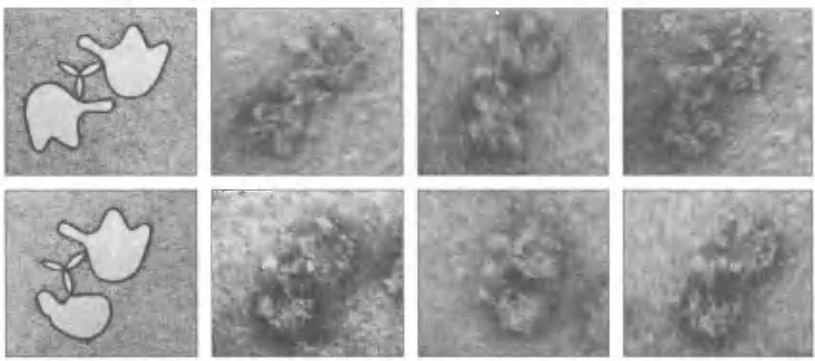
расщепления ГТФ. В этом отношении изолированная 50S субъединица рибосомы ведет себя как полная рибосома: EF-G в комплексе с GMP-PCP, как и EF-G в комплексе с ГДФ в присутствии фусидовой кислоты, образуют достаточно стабильные комплексы с большой субъединицей, а взаимодействие EF-G плюс ГТФ с 50S субъединицей приводит к гидролизу ГТФ и освобождению EF-G и ГДФ. Отсюда следует заключение, что участок связывания факторов элонгации, как, очевидно, и других ГТФ-зависимых факторов трансляции, располагается на большой рибосомной субъединице.

Положение участка связывания ГТФ-связывающих белковых факторов трансляции на 50S субъединице было определено с использованием иммунной электронной микроскопии (рис. 8.9). С этой целью было сделано фотоактивируемое арилазидное производное EF-G, которое специфически связали с частицей в присутствии ГТФ и фусидовой кислоты. Затем путем облучения было обеспечено ковалентное сшивание между EF-G и участком его связывания. Субъединицы с таким ковалентно связанным белком (EF-G) были обработаны антителами против EF-G, и комплексы были изучены методом электронной микроскопии (Гиршович и др., 1981). На рис. 8.9, *А* показано расположение участка прикрепления антител у основания палочкообразного выступа L7/L12 на контактирующей (обращенной к малой субъединице) поверхности 50S рибосомной субъединицы.

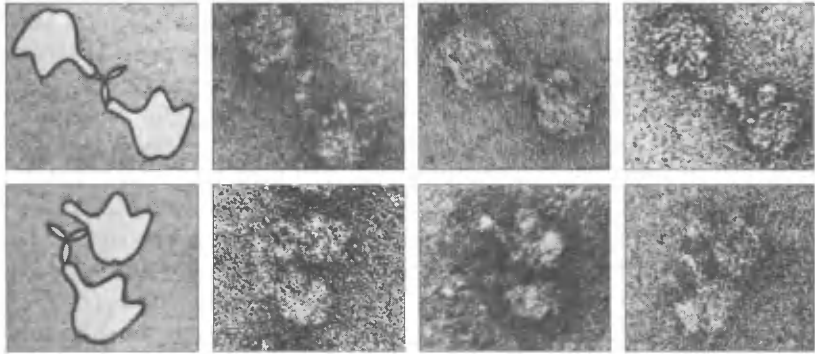
Другой фактор элонгации — EF1A (EF-Tu) доставляется в рибосому как комплекс с аминоацил-тРНК и ГТФ. Исследования с помощью иммунной электронной микроскопии (Гиршович и др., 1986) показали, что антитела против EF-Tu обнаруживаются у основания бокового палочкообразного выступа L7/L12 большой рибосомной субъединицы (см. рис. 8.9, *Б*), как и в случае фактора EF-G, а также на самом палочкообразном выступе («пальце»).

Было показано, что взаимодействие бактериальной рибосомы с EF-G или EF-Tu приводит к защите так называемой сарцин-рициновой петли домена VI в 23S рРНК от химических модификаций. Это торцевой конец первой шпильки домена VI (шпилька H95, позиции 2646—2674, см. рис. 6.2, *Б*), известной как мишень для двух специфических ферментов, инактивирующих рибосому: сарцина — нуклеаза, которая специфически расщепляет межнуклеотидную связь между G2661 и A2662, и рицина — N-гликозидаза, которая производит депуринизацию A2660 (см. также подразд. 12.5.3 и 12.5.4). Шпилька включает одну из наиболее консервативных нуклеотидных последовательностей 23S рРНК. Хотя вначале полагали, что отсутствие классической комплементарности между участками цепей 2653—2660 и 2661—2667 должно приводить к однотяжевой конформации торцевой петли, исследования структуры этой шпильки методами ЯМР и рентгеноструктурного анализа показали ее жесткую, фиксированную организацию в единую двутяжевую структуру — деформированную двойную спираль со специфической геометрией и стабильной тетрапетлей на торце; на верхушке тетрапетли находится A2660 (рис. 8.10). Было показано, что EF-G и EF-Tu, связанные с рибосомой в присутствии ГТФ или его нерасщепляемого аналога, защищают от химических модификаций прежде всего самую верхушку шпильки — A2660 и G2661. Был сделан вывод, что сарцин-рициновая петля 23S рРНК является основным участком взаимодействия большой субъединицы рибосомы с обоими факторами элонгации — EF-Tu и EF-G.

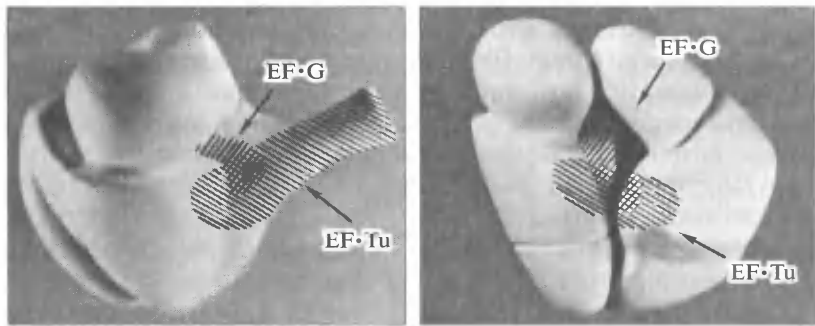
В дополнение к вышесказанному выяснилось, что EF-G защищает A1067 в торцевой петле эволюционно консервативной шпильки H43 домена II 23S рРНК (см. рис. 6.2, *А*). EF-G, связанный с рибосомой, также может быть химически



A



B



B

Рис. 8.9. Локализация участка связывания факторов элонгации на 50S рибосомной субъединице методом иммуноэлектронной микроскопии.

A: электронная микрофотография 50S субъединиц, связанных с молекулами EF-G, прореагировавшими с антителами. Girshovich et al. (1981) *FEBS Letters* **130**: 54–59.

B: электронная микрофотография 50S субъединиц, связанных с молекулами EF-Tu, прореагировавшими с антителами. Girshovich et al. (1986) *FEBS Letters* **197**: 192–198.

B: модель 70S рибосомы с локализацией мест связывания EF-G и EF-Tu у основания L7/L12-стержня и на нем (соответствующие области заштрихованы).

Оригинальные фотографии предоставлены В.Д. Васильевым

сшит с упомянутой петлей. Известно, что на этой части структуры 23S рРНК (трехходовая спиральная структура H42–H43–H44, образуемая нуклеотидной последовательностью 1030 — 1124) размещаются комплекс белков L10•(L7/L12)₄ и бе-

Рис. 8.10. Вторичная структура так называемой «сарцин-рициновой петли» — шпильки H95 домена VI 23S рРНК, участвующей в связывании факторов элонгации.

PDB ID 480d. Correll et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 292: 275—287

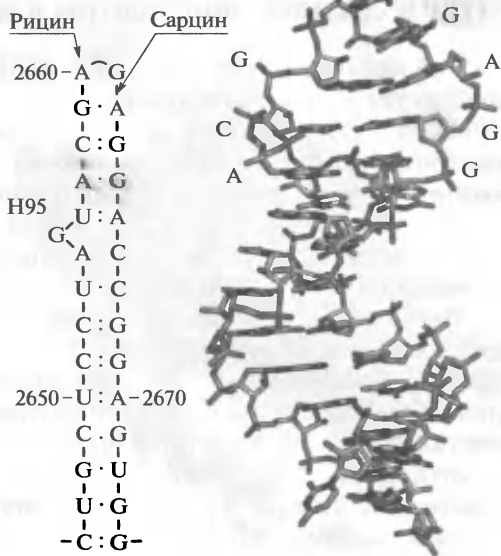
лок L11, и данная структура является участком взаимодействия с антибиотиками тиострептоном и микрококцином. Указанные антибиотики (в присутствии белка L11), будучи связанными с рибосомой, препятствуют связыванию EF-G рибосомой. 2'-О-метилирование A1067 придает рибосоме устойчивость к антибиотикам. Рассматриваемый структурный элемент 23S рРНК иногда называется «ГТФазной областью», так как необходим для индукции ГТФазной активности после присоединения фактора с ГТФ к рибосоме.

Итак, можно заключить, что EF-G и, очевидно, другие ГТФ-зависимые факторы трансляции взаимодействуют с двумя областями рРНК большой субъединицы — сарцин-рициновой шпилькой домена VI и трехходовой спиральной структурой домена II, взаимодействующей с белками L11 и L10.

Это заключение подтверждается исследованиями участка связывания тиострептона. Тиострептон (см. далее, рис. 9.13) — антибиотик, который прочно связывается с рибосомой и предотвращает связывание EF-G и EF-Tu с 50S рибосомной субъединицей. Было показано, что антибиотик связывается с субъединицей в области белка L11 и в области последовательности 1050 — 1110 (H43-H44) 23S рРНК, защищаемой белком L11 от химических модификаций. Это та же область, к которой может быть пришит EF-G и где он защищает нуклеотидные остатки от химических реагентов. Белок L11 четко локализуется в основании палочкообразного выступа большой субъединицы и представляет собой связующее звено, соединяющее комплекс белков L10•(L7/L12)₄ с 23S рРНК.

Кристаллографические исследования большой (50S) рибосомной субъединицы прямо показали, что обе вышеуказанные области 23S рРНК — сарцин-рициновая петля домена VI и трехходовая спиральная структура домена II — сближены и вместе формируют боковой выступ компактно свернутой РНК, на котором крепятся белок L11 (см. рис. 7.12) и белковый комплекс L10•(L7/L12)₄. Таким образом, обе факторсвязывающие области 23S рРНК расположены у основания палочкообразного выступа L7/L12, со стороны малой субъединицы.

Необходимо отметить, что хотя за узнавание и связывание EF-G ответственной является большая (50S) субъединица рибосомы, EF-G, связанный с полной рибосомой, контактирует также и с малой (30S) субъединицей. Удлиненный домен IV связанного с рибосомой EF-G выдвигается из большой субъединицы по направлению к малой субъединице и достигает ее декодирующего центра в районе «шеи» (Уилсон и Ноллер, 1998), а домен III (EF-G) соседствует с белком S12 малой субъединицы (Гиршович и др., 1981; Нечифор и Уилсон, 2007).



8.5. Связывание аминоксил-тРНК и удерживание пептидил-тРНК (тРНК-связывающие центры в межсубъединичном пространстве)

Рибосоме присуще сродство к тРНК: вакантная рибосома может связывать любую тРНК или ее производное (например, аминоксил-тРНК или пептидил-тРНК) в отсутствие матричного полинуклеотида. Присутствие матричного полинуклеотида делает это связывание специфичным: только тРНК, соответствующая кодону, установленному в декодирующем центре рибосомы, — «своя» (*cognate*) тРНК — будет должным образом связана рибосомой. «Свой» кодон оказывает положительное, а «не свой» — отрицательное дискриминирующее действие на связывание тРНК с рибосомой.

Поскольку в центральной химической реакции цикла элонгации участвуют два субстрата, аминоксил-тРНК и пептидил-тРНК, основной вопрос заключается в том, где в рибосоме расположены соответствующие *A*- и *P*-участки их связывания. В основу любых рассуждений относительно расположения тРНК в транслирующей рибосоме должны быть положены следующие очевидные постулаты: 1) антикодоны двух тРНК, одна из которых сидит в *A*-участке, а другая — в *P*-участке, должны быть расположены вплотную друг к другу, для того чтобы обеспечить их взаимодействия со смежными кодонами вдоль цепи мРНК; 2) акцепторные концы двух тРНК также должны находиться в непосредственной близости друг к другу, чтобы обеспечить реакцию транспептидации между ними. Кроме того, как показали специальные измерения расстояний между некоторыми нуклеотидными остатками двух тРНК в рибосоме, их центральные ядра («углы») двух *L*-образных молекул тРНК также сближены. Таким образом, две молекулы тРНК в *A*- и *P*-участках рибосомы располагаются бок о бок, почти параллельно. (В геометрическом смысле это значит, что две рассматриваемые молекулы тРНК связаны друг с другом в основном операцией трансляционного перемещения вдоль оси, направленной перпендикулярно плоскости молекул.) Лишь немного оказываются раздвинутыми их центральные ядра по сравнению с более сближенными антикодонами и акцепторными концами.

В соответствии со всеми имеющимися данными, изложенными в подразд. 8.2, кодоны мРНК, а следовательно, и антикодоны тРНК находятся на малой субъединице транслирующей рибосомы, в щели, отделяющей головку от тела и от бокового выступа («платформы»), т. е. на «шее» малой субъединицы. В то же время пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) и, таким образом, акцепторные концы молекул тРНК находятся на большой субъединице, в углублении, разделяющем центральный выступ большой субъединицы и ее тело. Таким образом, реагирующие молекулы тРНК в транслирующей рибосоме располагаются в межсубъединичном пространстве, в канале между «шеями» субъединиц, и ось, соединяющая район антикодонов (АС) с районом акцепторных концов (ПТЦ) рассматриваемой пары тРНК, должна быть направлена более или менее перпендикулярно границе раздела субъединиц.

Рентгеноструктурные исследования кристаллов рибосом с занятыми *A*- и *P*-участками, а также данные криоэлектронной микроскопии высокого разрешения позволили прямо подтвердить сделанные заключения о расположении тРНК в рибосоме и относительно друг друга. При этом была установлена ориентация пары тРНК относительно головки и тела субъединиц: центральные ядра («углы») двух *L*-образных молекул тРНК оказались обращенными к головкам субъединиц. На рис. 8.11 и рис. 8.V цв. вкл. представлены модели 30S рибосомной субъедини-

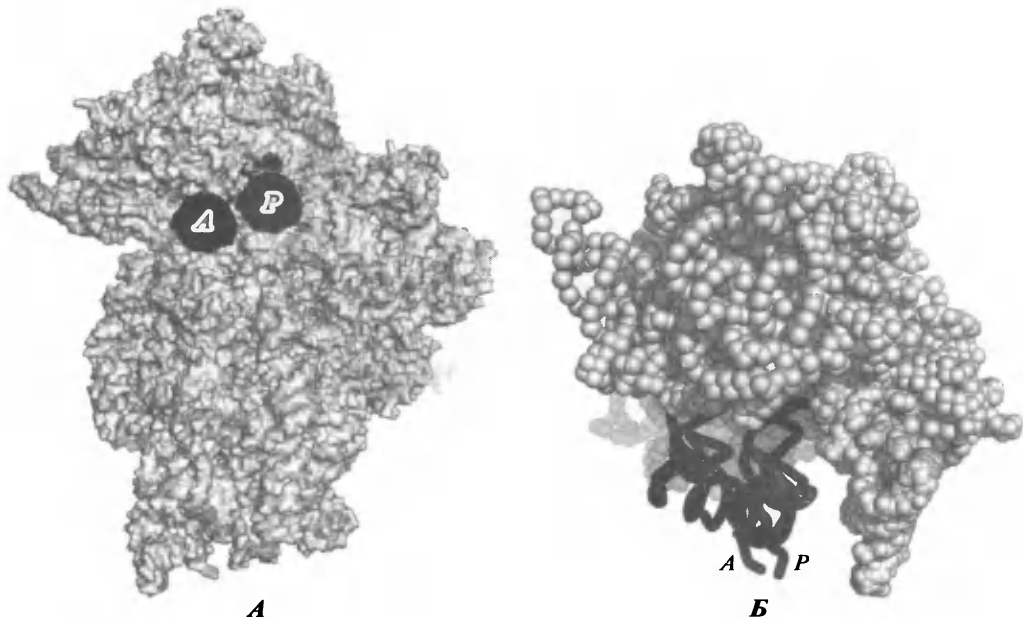


Рис. 8.11. Локализация *A*- и *P*-участков связывания тРНК на контактирующей поверхности 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

А: 30S субъединица расположена своей контактирующей стороной к зрителю, и две антикодоновые шпильки молекул тРНК, связанные с кодонами мРНК в «шейной» борозде субъединицы, обращены своими торцами на зрителя.

Б: 30S субъединица с двумя молекулами тРНК, связанными своими антикодонами с кодонами мРНК, проходящей в «шейной» борозде субъединицы, развернута своей «головкой» к зрителю. Молекулы тРНК, связанные в *A*- и *P*-участках, свисают с контактирующей поверхности вниз, и в полной 70S рибосоме их акцепторные концы оказываются погруженными в глубокую борозду на контактирующей поверхности 50S субъединицы, в район ПТЦ.

PDB ID 2J00. Selmer et al. (2006) *Science* 313: 1935—1942

цы с молекулами тРНК, связанными своими антикодонами с кодонами мРНК, проходящей в шейной борозде частицы. На рис. 8.11, *А* 30S рибосомная субъединица показана с контактирующей (обращенной к 50S субъединице) стороны, и из нее на зрителя направлены торцы антикодоновых шпилек двух тРНК, связанных в *A*- и *P*-участках на «шейной» борозде частицы. На рис. 8.11, *Б* 30S рибосомная субъединица обращена к зрителю своей головкой, и две молекулы тРНК, связанные в *A*- и *P*-участках, свисают с контактирующей поверхности вниз, чтобы в полной рибосоме встретиться с ПТЦ на большой субъединице; видно погружение антикодоновых участков тРНК в «шейную» борозду частицы.

На рис. 8.12 и рис. 8.VI цв. вкл. приведены модели 50S рибосомной субъединицы с молекулами тРНК в положениях, когда они связаны в полной 70S рибосоме со своими кодонами в тех же *A*- и *P*-участках, что и на предыдущем рисунке. На рис. 8.12, *А*, где показана контактирующая (обращенная к 30S рибосомной субъединице) поверхность большой субъединицы, видно, что акцепторные концы обеих тРНК утоплены в борозде между центральным выступом и остальным «телом» частицы, а антикодоновые ветви молекул обращены к зрителю. На рис. 8.12, *Б* показана 50S субъединица, обращенная зрителю своим центральным выступом; в таком ракурсе антикодоновые ветви двух тРНК торчат вертикально вверх, в

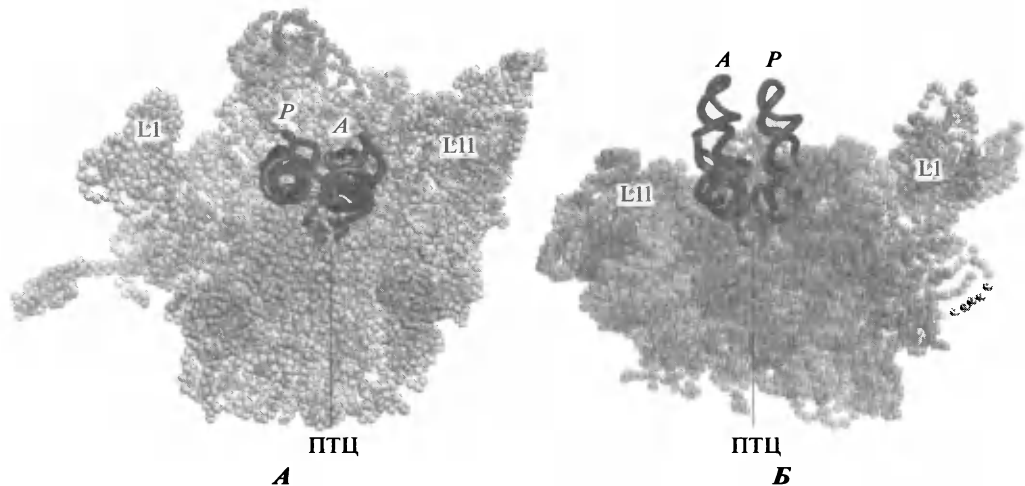


Рис. 8.12. Локализация *A*- и *P*-участков связывания тРНК на контактирующей поверхности 50S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

А: 50S субъединица обращена своей контактирующей стороной к зрителю, и две молекулы тРНК, связанные своими акцепторными концами в районе ПТЦ, направлены на зрителя своими антикодонами, так что в полной 70S рибосоме их антикодоны оказываются в контакте с декодирующим центром 30S субъединицы.

Б: 50S субъединица с двумя молекулами тРНК, связанными своими акцепторными концами с ПТЦ в глубокой борозде субъединицы, развернута своим центральным выступом («головкой») к зрителю и контактирующей поверхностью вверх. Молекулы тРНК *A*- и *P*-участков обращены антикодонами своими шпильками вверх, так что в полной 70S рибосоме их антикодоны оказываются погруженными в «шейную» борозду 30S субъединицы.

PDB ID 2J01. Selmer et al. (2006) *Science* **313**: 1935–1942

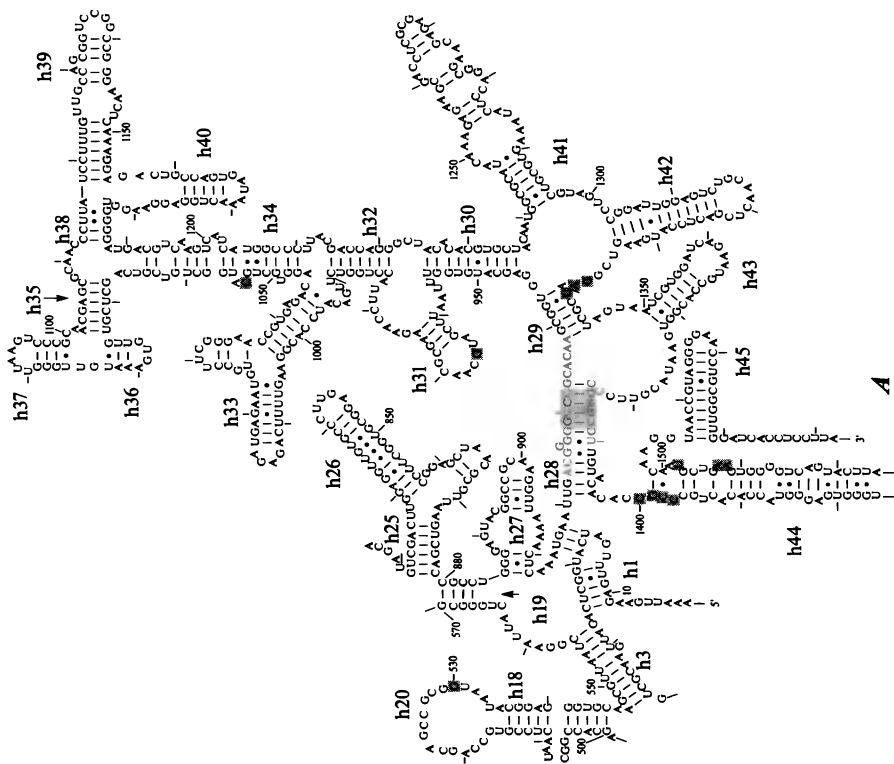
полной рибосоме взаимодействуя с кодонами на «шее» 30S рибосомной субъединицы. Видно также погружение акцепторных концов тРНК в район ПТЦ за центральным выступом.

Итак, в полной 70S рибосоме антикодоны тРНК упираются в «шею» малой субъединицы, а их акцепторные концы фиксированы в ПТЦ большой субъединицы на границе между центральным выступом и ее телом.

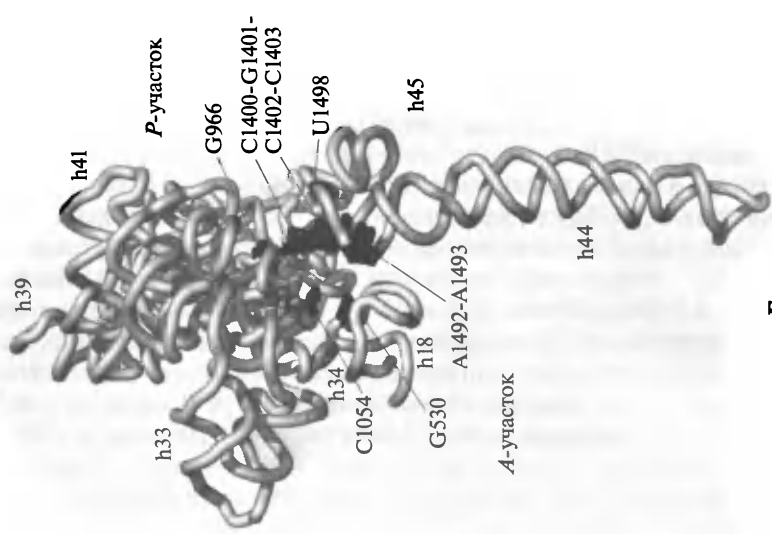
8.5.1. *A*-участок

В процессе трансляции, когда *P*-участок занят пептидил-тРНК (см. рис. 8.3, сверху), рибосома приобретает способность связывать молекулу аминоксил-тРНК, и это связывание происходит в *A*-участке. Связывание в *A*-участке является кодон-специфичным: связывается только тРНК, которая соответствует кодону, установленному в *A*-участке декодирующего центра. Однако удержание тРНК в *A*-участке обусловлено не только специфическим кодон-антикодонным взаимодействием в рибосоме, но также и некоторыми дополнительными, не специфическими по отношению к виду тРНК взаимодействиями с компонентами обеих рибосомных субъединиц.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа (Юсупов, Ноллер и др., 2001; Рамакришнан и др., 2000, 2006), остаток G530 петли шпильки h18 (домен I) и консервативные A1492 и A1493 основания шпильки h44 взаимодействуют своими



А



Б

Рис. 8.13. Организация декодирующего центра и тРНК-связывающих участков на 16S рРНК 30S рибосомной субъединицы. **А:** схема вторичной структуры района 16S рРНК, участвующего в формировании тРНК-связывающих участков — домена III с прилегающими спиралью домена I и 3'-концевыми шпильками h44 и h45. Нуклеотидные остатки, непосредственно участвующие в связывании молекул тРНК, выделены серым фоном (см. рис. 6.1). **Б:** схема третичной структуры домена III с прилегающими спиральями h18, h44 и h45 по данным рентгеноструктурного анализа. Нуклеотидные остатки, участвующие в связывании тРНК в А- и Р-участках, указаны и выделены черным

N1 с парами оснований в малом желобке образующейся кодон-антикодоновой двойной спирали в *A*-участке (рис. 8.13). Кроме того, в удержании антикодоновой шпильки тРНК на малой субъединице принимает участие спираль h34 домена III (остаток C1054). Отмечается также близость простертых петель белков S12 и S13 к местам связывания антикодоновой шпильки на малой субъединице; эти белки могут либо стабилизировать контакты двух РНК, либо сами образовывать дополнительные контакты с тРНК.

Акцепторный ССА-конец молекулы тРНК и аминокислотный остаток взаимодействуют с *a*-участком ПТЦ как частью полного тРНК-связывающего *A*-участка на большой (50S или 60S) субъединице, а именно с нуклеотидными остатками «ПТЦ-кольца» и его спиральных шпилек (см. подразд. 8.3 и рис. 8.11), включая комплементарное взаимодействие С75 тРНК с G2553 торцевой петли спирали H92 домена V. Кроме того, тРНК, сидящая в *A*-участке, удерживается на большой субъединице неспецифическими взаимодействиями между ее «углом» (петлями *D* и *TΨ*) и торцевой частью спирали H38 домена II 23S рРНК (см. рис. 6.2, *A*) и между ее *TΨ*-спиралью и лежащей параллельно спиралью H89 домена V 23S рРНК (см. рис. 8.11).

8.5.2. *P*-участок

В случаях, когда тРНК или ее производные акцептируются вакантной рибосомой, один из двух тРНК-связывающих участков заполняется первым. Это участок, который в транслирующей рибосоме, перед связыванием аминокислот-тРНК и транспептидазией, занимает пептидил-тРНК, а именно *P*-участок (см. рис. 8.3, сверху и справа внизу). В процессе трансляции тРНК попадает в *P*-участок только из *A*-участка в результате транслокации (см. рис. 8.3, *З*). Сродство тРНК к *P*-участку существенно выше, чем к *A*-участку, что создает термодинамические предпосылки для спонтанной транслокации остатка тРНК из *A*-участка в *P*-участок после транспептидации (см. гл. 11).

При транслокации тРНК из *A*-участка в *P*-участок связанный с ней кодон мРНК перемещается вместе с антикодоном тРНК. Таким образом, тРНК в *P*-участке, как и тРНК в *A*-участке, закреплена своим антикодоном на мРНК в районе декодирующего центра, т.е. на «шее» малой рибосомной субъединицы. В то же время акцепторный конец тРНК в *P*-участке несет донорный субстрат — С-конец пептидильного остатка — и должен фиксироваться *p*-участком ПТЦ на большой субъединице рибосомы. Таким образом, полный тРНК-связывающий *P*-участок, подобно *A*-участку, формируется обеими субъединицами рибосомы.

На малой субъединице полной рибосомы в *P*-участке удерживается лишь антикодоновая шпилька тРНК, а остальная часть молекулы взаимодействует с большой субъединицей. Кодон-антикодоновая спираль в *P*-участке малой рибосомной субъединицы взаимодействует с C1402, C1403 и U1498 основания шпильки h44, а также C1400 и G966 шпильки h31 (см. рис. 8.13). В дополнение к кодон-антикодоновому взаимодействию ряд взаимодействий антикодоновой шпильки с рибосомной 16S рРНК обеспечивают ее прочную фиксацию в *P*-участке. Это прежде всего взаимодействия двуспиральной части антикодоновой шпильки тРНК с остатками G1338 и A1339 между спиралями h29 и h42 (см. рис. 8.13) и контакт антикодоновой петли с торцевой петлей спирали h24 на боковой лопасти субъединицы (остаток A790, домен II). Вышеперечисленные спирали вместе со спи-

ралью h28 и примыкающим основанием шпильки h44, входящими в декодирующий центр (см. подразд. 8.2), формируют *P*-участок на малой субъединице. Кроме того, в формирование и стабилизацию участка вовлечены С-концевые «хвосты» белков S9 и S13.

Следует добавить, что спираль h28 — это как раз сам ковалентный остов «шей» 30S рибосомной субъединицы, соединяющий головку с остальным телом. Она характеризуется, с одной стороны, высокой стабильностью, имея в своем составе шесть G:C пар подряд, а с другой стороны, именно она, и именно ее самый стабильный район остатков 929—932, спаренный с районом остатков 1388—1385, претерпевает конформационное изменение при транслокации, сопровождающееся вращением головки на 12—20° (см. гл. 11).

Весьма существенный вклад в удержание пептидил-тРНК в транслирующей рибосоме вносит и большая субъединица. Кроме взаимодействия акцепторного конца тРНК с *p*-участком ПТЦ (см. далее), остаток тРНК в *P*-участке на большой субъединице взаимодействует спиралью *D*-шпильки со спиралью H69 домена IV (см. рис. 6.2), а своим «углом» (*TΨ*-петлей) и спиралью акцепторного черешка, соответственно, со спиральями H84 и H80 домена V 23S РНК (см. рис. 8. III цв. вкл.). Во взаимодействии *TΨ*-петли со спиралью H84 принимает участие «хвост» белка L5.

Удержание пептидил-тРНК в *P*-участке транслирующей рибосомы имеет важную особенность: пептидил-тРНК не должна быть способной к обмену с окружающей средой во время трансляции, т.е. должна быть окклюдирована в рибосоме. Когда же в *P*-участке оказывается деацилированная тРНК или аминоксил-тРНК, он становится обмениваемым, и тРНК в нем может быть заменена или освобождена. Прочное, практически необратимое удержание пептидил-тРНК в *P*-участке транслирующей рибосомы обусловлено, очевидно, вкладом пептидильного остатка, а точнее — его С-концевой сложноэфирной группы, которая закрывается рибосомой (ее большой субъединицей) в *p*-участке ПТЦ (см. подразд. 8.3). В результате транспептидации (см. рис. 8.3, 2) прежняя сложноэфирная группа в *p*-участке ПТЦ исчезает — заменяется на пептидную (см. рис. 8.5), а в ПТЦ появляется новая сложноэфирная группа, которая (вместе с новообразованной пептидной группой) характеризуется высоким сродством к *p*-участку, что является предпосылкой для последующей транслокации новообразованной пептидил-тРНК из *A*-участка в *P*-участок.

Важно еще раз подчеркнуть, что остатки тРНК в *A*- и *P*-участках транслирующей рибосомы тесно сближены, расположены почти параллельно друг другу, и имеются даже основания предполагать существование прямого взаимодействия между «боками» их центральных ядер, а именно между основаниями hU16 *A*-тРНК и U47 *P*-тРНК.

8.5.3. *E*-участок: участок выхода деацилированной тРНК

При транслокации остатка тРНК из *A*-участка в *P*-участок деацилированная тРНК, образовавшаяся в качестве одного из продуктов реакции транспептидации, вытесняется из *P*-участка (рис. 8.3, 3). Однако деацилированная тРНК не освобождается непосредственно в окружающую среду, а временно задерживается в рибосоме в так называемом *E*-участке (*Exit site*). По-видимому, основным функциональным назначением *E*-участка является увод продукта пепти-

дилтрансферазной реакции из зоны реакции — в первую очередь, увод деацелированного конца тРНК, а конкретно — ее концевое аденозина А76, из ПТЦ в ходе реакции для предотвращения обратной реакции. В соответствии с этим на большой рибосомной субъединице вне ПТЦ имеется специальный центр — *e*-участок, обладающий сродством именно к деацелированному аденозину и связывающий деацелированный ССА-конец тРНК. Этот ССА-«хвост» помещается в кармане большой субъединицы, отделенном от щели, где находится ПТЦ, и взаимодействует с остатками при основании спирали Н82, в то время как ТΨ- и *D*-петли («угол») тРНК вступают в контакт со спиралью Н76—Н77 домена V и сидящими на них белком L1 бокового выступа, фиксируя боковой выступ в «закрытом» (прижатом к основному телу субъединицы) состоянии (Рамакришнан и др., 2006). При этом 3'-концевой остаток А76 деацелированной тРНК оказывается интеркалирован между G2421 и C2422 в основании спирали Н88 и еще образует водородную связь с C2394 при основании той же спирали. По-видимому, подвижность района Н76—Н77—L1 регулирует блокирование деацелированной тРНК в *E*-участке и ее освобождение из рибосомы на конечной стадии транслокации (см. гл. 11). В целом акцепторная ветвь и «угол» (центральное ядро) деацелированной тРНК, сидящей в *E*-участке, существенно отодвинуты от тРНК *P*-участка; акцепторные ССА-концы этих двух тРНК оказываются разнесены почти на 50 Å.

Положение деацелированной тРНК в *E*-участке полной рибосомы таково, что ее антикодонавая ветвь остается в контакте с малой субъединицей, хотя взаимодействия с кодоном мРНК, по-видимому, уже нет (Рамакришнан и др., 2006). Антикодонавая шпилька тРНК, сидящей в *E*-участке, помещается в щели между головкой и боковым выступом («платформой») малой субъединицы и находится в окружении спиралей h23 и h24 домена II (см. рис. 6.1) и h28 и h29 домена III 16S рРНК (см. рис. 8.13), но прямо взаимодействует лишь с белками S7 и S11.

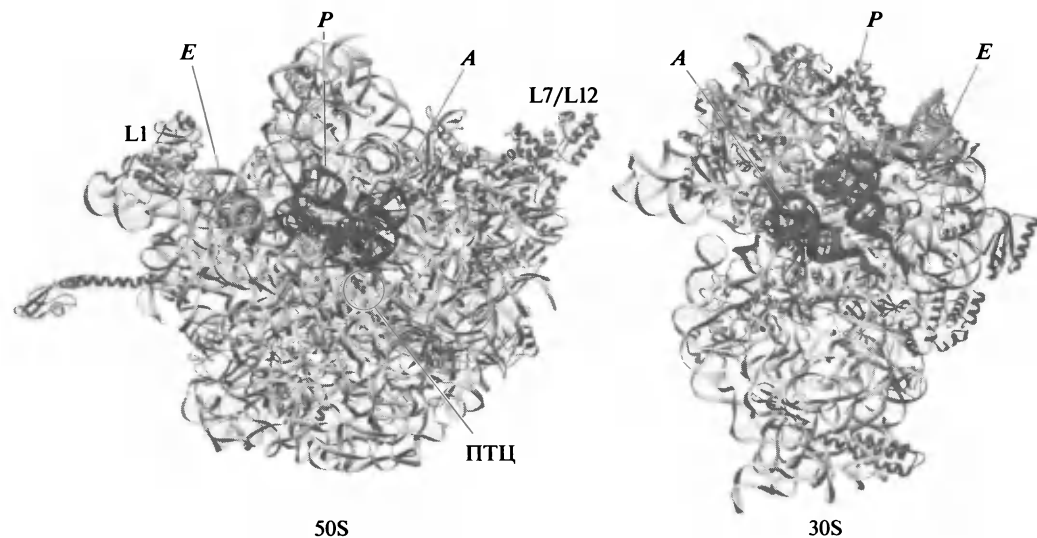


Рис. 8.14. Расположение молекул тРНК в *A*-, *P*- и *E*-участках на контактирующих поверхностях каркасов рибосомных РНК большой и малой субъединиц по данным рентгеноструктурного анализа функциональных комплексов бактериальной рибосомы.

Воспроизведено из Ramakrishnan (2002) *Cell* **108**: 557—572, с разрешения автора и издательства

Расположение молекул тРНК в *A*-, *P* и *E*-участках на контактирующих поверхностях каркасов рРНК большой и малой субъединиц, как установлено путем прямого рентгеноструктурного анализа функциональных комплексов бактериальной рибосомы, представлено на рис. 8.14 и рис. 8.VII цв. вкл. Следует отметить, что ситуации, когда все три тРНК одновременно присутствуют в транслирующей рибосоме, по-видимому, не бывает, и приведенная схема является не более, чем иллюстрацией положения трех различных тРНК-связывающих участков.

8.5.4. Промежуточные, или «гибридные», положения тРНК в транслирующей рибосоме

В процессах связывания с *A*-участком, транслокации из *A*-участка в *P*-участок, вытеснения из *P*-участка в *E*-участок и выхода из *E*-участка соответствующие лиганды — аминоацил-тРНК, пептидил-тРНК и деацилированная тРНК — проходят через промежуточные состояния связывания с рибосомой. Особое место занимают так называемые «гибридные» положения тРНК-лигандов (Моазед и Ноллер, 1989; Ноллер и др., 1990), обусловленные двухсубъединичным строением рибосомы.

Прежде всего, входящая в рибосому аминоацил-тРНК, находящаяся в комплексе с белковым фактором EF1A (EF-Tu), специфически взаимодействует своим антикодоном с кодоном мРНК и связывается в *A*-участке на малой субъединице, но ее акцепторный район и аминоацильный остаток связаны с EF1A (EF-Tu), взаимодействующим с факторсвязывающим участком на большой субъединице. Поэтому поступившая в рибосому аминоацил-тРНК не может быть субстратом для транспептидации, пока ГТФ не подвергнется гидролизу и EF1A (EF-Tu) не покинет рибосому. Таким образом, до гидролиза ГТФ аминоацил-тРНК задерживается в промежуточном положении, которое можно обозначить как *A/T*, когда антикодоновая ветвь молекулы лежит в *A*-участке на малой субъединице, а акцепторная ветвь связана с фактором Tu на большой субъединице и еще не связана с ПТЦ (рис. 8.15, *A*). Аминоацил-тРНК может быть удержана в этом положении, если ГТФ заменить его нерасщепляемым аналогом — GMP-PCP или GMP-PNP — в комплексе с Aa-tRNA • EF-Tu. Лишь гидролиз ГТФ и последующее освобождение EF-Tu позволяет акцепторному концу и его аминоацильному остатку взаимодействовать непосредственно с большой субъединицей, а именно с *a*-участком ПТЦ и другими структурами большой субъединицы, вместе формирующими ее *A*-участок. Таким образом, аминоацил-тРНК переходит в положение *A/a*, и этим завершается кодонзависимое связывание аминоацил-тРНК с рибосомой (см. рис. 8.15, *B*).

Итак, в результате полного связывания аминоацил-тРНК с *A*-участком рибосомы, два субстрата — аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК — устанавливаются рядом в положениях *A/a* и *P/p* соответственно (см. рис. 8.15, *B*). Последующая транспептидация дает два продукта, удерживаемых рибосомой, — деацилированную тРНК в *P*-участке и удлиненную на один остаток пептидил-тРНК в *A*-участке. Однако акцепторный конец деацилированной тРНК в силу его особого родства к *e*-участку стремится переместиться туда, и это происходит на начальной стадии транслокации: акцепторный конец деацилированной тРНК покидает ПТЦ, и деацилированная тРНК переходит в промежуточное — «ги-

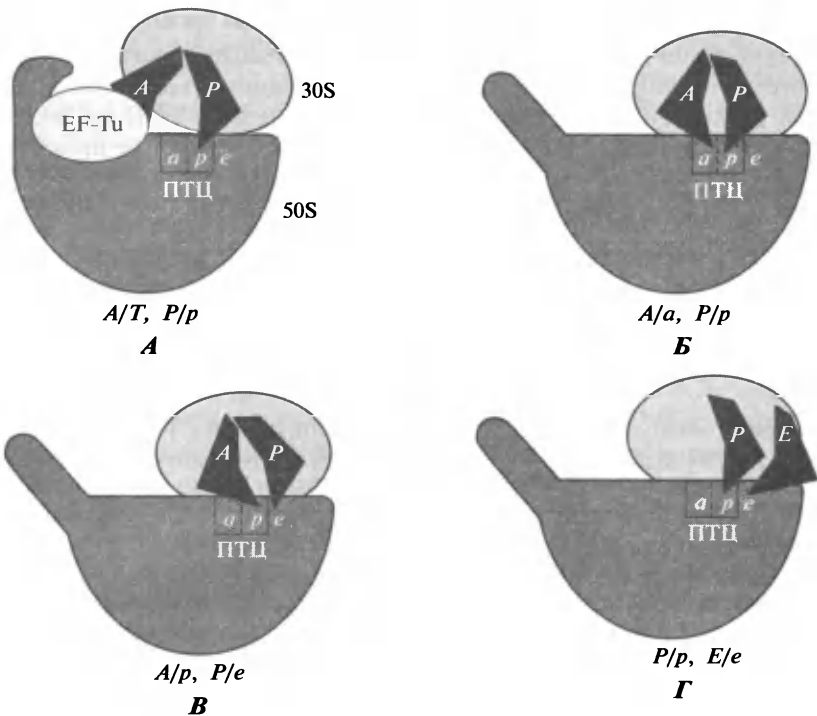


Рис. 8.15. Состояния связывания молекул тРНК в рибосоме в процессе ее функционирования.

A: состояние $A/T, P/p$, когда пептидил-тРНК занимает P -участок на 30S субъединице и p -участок в ПТЦ 50S субъединицы, а аминоацил-тРНК занимает A -участок на 30S субъединице, но ее аминоацильный конец закреплен на факторе элонгации EF-Tu, связанном с 50S субъединицей.

Б: состояние $A/a, P/p$, когда пептидил-тРНК занимает P -участок на 30S субъединице и p -участок в ПТЦ 50S субъединицы, а аминоацил-тРНК занимает A -участок на 30S субъединице и a -участок в ПТЦ 50S субъединицы.

B: «гибридное» состояние $A/p, P/e$, когда пептидил-тРНК занимает A -участок на 30S субъединице, но ее сложноэфирная группа перемещена в p -участок 50S субъединицы, в то время как деацилированная тРНК занимает P -участок на 30S субъединице, но ее деацилированный 3'-конец смещен за пределы ПТЦ в e -участок 50S субъединицы.

Г: состояние $P/p, E/e$, когда пептидил-тРНК занимает P -участок на 30S субъединице и p -участок в ПТЦ 50S субъединицы, а деацилированная тРНК занимает E -участок на 30S субъединице и e -участок на 50S субъединице

«гибридное» — положение P/e , занимая P -участок на малой субъединице и e -участок на большой субъединице. Одновременно новообразованная пептидная группа и сложноэфирная группа удлиненной пептидил-тРНК, сидящей в A -участке, захватываются p -участком ПТЦ, и акцепторная ветвь пептидил-тРНК оказывается в p -участке большой субъединицы, что переводит пептидил-тРНК в промежуточное — «гибридное» — положение A/p , когда она занимает A -участок малой субъединицы и p -участок большой субъединицы (см. рис. 8.15, **B**).

При завершении транслокации деацилированная тРНК выходит из P -участка на малой субъединице и переходит на контакты со структурами E -участка, т.е. в положение E/e , а антикодонная ветвь пептидил-тРНК вместе со «своим» кодоном мРНК перемещается в P -участок на малой субъединице, приобретая свое нормальное положение как донорного субстрата — P/p (см. рис. 8.15, **Г**).

8.6. Перемещения лигандов: функция транслокации

В ходе рабочего цикла рибосомы за стадией транспептидации следует стадия транслокации, когда происходит одновременное масштабное смещение трех больших лигандов: мРНК, пептидил-тРНК и деацилированной тРНК. Эти перемещения можно определить как механическую функцию рибосомы. Ни одна из изолированных субъединиц рибосомы не способна выполнять данную функцию; очевидно, механическая функция требует обеих субъединиц и их лабильного сочленения друг с другом.

В поиске молекулярных механизмов, ответственных за направленные перемещения больших молекулярных лигандов, необходимо в первую очередь рассмотреть возможную крупноблочную подвижность в пределах целой рибосомы и ее отдельных субъединиц. Экспериментально показаны взаимные смещения двух рибосомных субъединиц друг относительно друга, подвижность головки и боковой лопасти («платформы») малой субъединицы, мобильность палочкообразного бокового выступа L7/L12 большой субъединицы, подвижность другого ее бокового выступа с белком L1, а также ряд других конформационных изменений рибосомы при ее функционировании. Взаимная подвижность частей рибосомы в ходе трансляции, и прежде всего транслокации, может лежать в основе работы рибосомы как молекулярной машины, осуществляющей векторный (однонаправленный) транспорт цепи мРНК и молекул тРНК сквозь межсубъединичный («межшейный») канал в направлении $A \rightarrow P \rightarrow E$. Эти и другие проблемы рассмотрены в заключительном подразд. 18.3 «Рибосома как молекулярная машина».

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 8

- Carter, A. P., Clemons, W. M. J., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**: 340—348.
- Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N., and Noller, H. F. (1999). X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* **285**: 2095—2104.
- Evstafieva, A. G., Shatsky, I. N., Bogdanov, A. A., Semenkov, Y. P., and Vasiliev, V. D. (1983). Localization of 5' and 3' ends of the ribosome-bound segment of template polynucleotides by immune electron microscopy. *EMBO J.* **2**: 799—804.
- Girshovich, A. S., Kurtskhalia, T. V., Ovchinnikov, Y. A., and Vasiliev, V. D. (1981). Localization of the elongation factor G on *Escherichia coli* ribosome. *FEBS Letters* **130**: 54—59.
- Girshovich, A. S., Bochkareva, E. S., and Vasiliev, V. D. (1986). Localization of elongation factor Tu on the ribosome. *FEBS Letters* **197**: 192—198.
- Hansen, J. L., Schmeing, T. M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002). Structural insights into peptide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11670—11675.
- Lipmann, F. (1969). Polypeptide chain elongation in protein biosynthesis. *Science* **164**: 1024—1031.
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**: 142—148.
- Monro, R. E. (1967). Catalysis of peptide bond formation by 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **26**: 147—151.
- Müller, F., and Brimacombe, R. (1997). A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. II. The RNA-protein interaction data. *J. Mol. Biol.* **271**: 545—565.
- Nathans, D. (1964). Puromycin inhibition of protein synthesis: Incorporation of puromycin

- mycin into peptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**: 585—592.
- Nechifor, R., and Wilson, K. S. (2007). Cross-linking of translation factor EF-G to proteins of the bacterial ribosome before and after translocation. *J. Mol. Biol.* **368**: 1412—1425.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920—930.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**: 897—902.
- Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., and Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**: 721—732.
- Schmeing, T. M., Seila, A. C., Hansen, J. L., Freeborn, B., Soukup, J. K., Scaringe, S. A., Strobel, S. A., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002). A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nature Struct. Biol.* **9**: 225—230.
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., and Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**: 1935—1942.
- Takanami, M., and Okamoto, T. (1963). Interaction of ribosomes and synthetic polyribonucleotides. *J. Mol. Biol.* **7**: 323—333.
- Takanami, M., and Zubay, G. (1964). An estimate of the size of the ribosomal site for messenger RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**: 834—839.
- Takyar, S., Hickerson, R. P., and Noller, H. F. (2005). mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* **120**: 49—58.
- Traut, R. R., and Monro, R. E. (1964). The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **10**: 63—72.
- Watson, J. D. (1964). The synthesis of proteins upon ribosomes. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **46**: 1399—1425.
- Wilson, K. S., and Noller, H. F. (1998). Mapping the position of translational elongation factor EF-G in the ribosome by directed hydroxyl radical probing. *Cell* **92**: 131—139.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Zh., Baucum, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**: 868—869.
- Yusupova, G. Zh., Yusupov, M. M., Cate, J. H. D., and Noller, H. F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106**: 233—241.

Обзоры

- Гудков А. Т. (1999). Белок L7/L12 и факторы элонгации. Структурный и функциональный аспекты. *Успехи биологической химии* **39**: 29—44.
- Noller, H. F., Moazed, D., Stern, S., Powers, T., Allen, P. N., Robertson, J. M., Weiser, B., and Triman, K. (1990). Structure of rRNA and its functional interactions in translation. In *The Ribosome: Structure, Function and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 73—92. ASM Press, Washington, D. C.

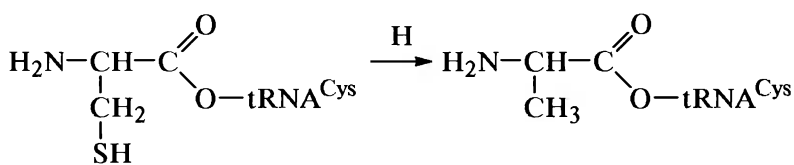
ЭЛОНГАЦИОННЫЙ ЦИКЛ, СТАДИЯ I: СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОАЦИЛ-тРНК

9.1. Кодон-антикодонное взаимодействие

Анализ цикла элонгации удобно начать с состояния, когда пептидил-тРНК занимает *P*-участок транслирующей рибосомы, в то время как *A*-участок с расположенным в нем кодоном матричного нуклеотида не заполнен (см. рис. 8.3, сверху). Такая рибосома способна связать следующую молекулу аминоксил-тРНК. Хотя в связывание аминоксил-тРНК с *A*-участком рибосомы вовлечено несколько связывающих центров участка и соответственно несколько областей молекулы тРНК, специфичность связанной аминоксил-тРНК зависит исключительно от кодона матричного полинуклеотида (мРНК). Другими словами, именно кодон ответственен за выбор соответствующей аминоксил-тРНК — «своей» аминоксил-тРНК, т.е. тРНК, несущей аминокислотный остаток, кодируемый данным кодоном.

9.1.1. Адаптерная гипотеза и ее доказательство

В соответствии с адаптерной гипотезой Крика (см. подразд. 3.1) структура аминокислотного остатка не имеет значения для выбора аминоксил-тРНК кодоном матричной РНК: кодон способен комплементарно взаимодействовать лишь с остатком тРНК, которая играет роль адаптера. Следовательно, аминокислотный остаток, прикрепленный к такому адаптеру, оказывается в рибосоме, не участвуя в узнавании кодона. Прямое экспериментальное доказательство этого постулата адаптерной гипотезы было получено в экспериментах, проведенных группами Липмана и Бензера в 1962 — 1963 гг. Cys-тРНК^{Cys} была подвергнута каталитическому восстановлению с использованием никеля Ренея, в результате чего остаток цистеина, оставаясь связанным с тРНК^{Cys}, был превращен в остаток аланина:

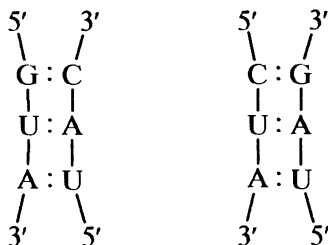


Когда такая Ala-тРНК^{Cys} была добавлена к бесклеточной системе, содержащей рибосомы, запрограммированные статистическим сополимером поли(U,G), кодирующим фенилаланин, лейцин, валин, глицин, триптофан и цистеин, но не аланин, наблюдался синтез аланинсодержащего полипептида. В другом эксперименте, где Ala-тРНК^{Cys} была добавлена к бесклеточной ретикулоцитной системе синтеза глобина, запрограммированной эндогенной мРНК, остатки аланина были включены в синтезированную полипептидную цепь в положениях, обычно занятых остатками цистеина.

9.1.2. Концепция комплементарного антикодона

Узнавание кодона происходит благодаря спариванию кодона с комплементарным нуклеотидным триплетом, представленным в адаптере (тРНК). Таким образом, выбор аминоксил-тРНК должен определяться комплементарностью между кодоном мРНК и триплетом в составе тРНК, который был назван *антикодоном*. Экспериментальное доказательство решающей роли комплементарности между кодоном и антикодоном в связывании аминоксил-тРНК было получено при изучении мутационно измененной тРНК, содержащей нуклеотидные замены в позициях 34—36 (см. рис. 3.7), которые соответствуют антикодону. Например, когда антикодон GUA в тРНК^{Tyr} *E. coli* заменяли на CUA, тРНК^{Tyr} больше не узнавала тирозиновый кодон UAC, но узнавала стоп-кодон UAG (Бреннер, Смит и др., 1968).

Таким образом, выбор аминоксил-тРНК для связывания с А-участком рибосомы является результатом комплементарного взаимодействия между кодоном и антикодоном. Это означает, что кодон и антикодон должны формировать комплекс с параметрами уотсон-криковской двойной спирали в А-форме. Характерные черты данного комплекса — антипараллельная ориентация цепей, образование стандартных пар оснований А:U, U:A, G:C и C:G, удерживаемых водородными связями, и стэкинг-взаимодействия между азотистыми основаниями дуплекса. В случае тирозиновой тРНК исходный антикодон и мутационно измененный антикодон должны быть спарены с тирозиновым кодоном и терминирующим кодоном соответственно, как показано ниже:



9.1.3. Нестрогое соответствие при кодон-антикодоновом спаривании (wobble-гипотеза Крика)

Оказалось, однако, что строгое каноническое спаривание азотистых оснований не является общим правилом для взаимодействия между первым остатком антикодона и третьим остатком кодона. Было отмечено, что если аминокислота кодируется двумя, тремя или четырьмя кодонами, первые два нуклеотидных остатка этих кодонов всегда идентичны; они различаются только по третьему положению. С другой стороны, рибосомы, запрограммированные различными кодонами, различающимися только по третьему положению и кодирующими одну и ту же аминокислоту, могут связывать один и тот же вид тРНК; другими словами, тРНК может узнавать более чем один кодон. Например, одна и та же тРНК^{Phe} узнает и UUU, и UUC.

Анализируя эти и другие факты, Крик в 1966 г. предложил гипотезу о неоднозначном спаривании первого нуклеотида антикодона с третьим нуклеотидом

кодона: он предположил возможность нестрогого соответствия спаривания азотистых оснований (*wobble*) в этой позиции правилам стандартного уотсон-криковского взаимодействия. Это предположение подразумевало, что в добавление к стандартным спариваниям А:U, U:A, G:C и C:G, а также I:C (I представляет собой дезаминированное производное А, которое спаривается так же, как G), могут формироваться неканонические пары, геометрические параметры которых близки к стандартным. Такие пары включают А:G; G:A и I:A; G:U и I:U; U:G; U:U; U:C и C:U (рис. 9.1).

Однако, для того чтобы предположение соответствовало фактам, во внимание должны были быть приняты следующие характеристики кодового словаря (см. рис. 2.2): 1) U и C, расположенные в третьем положении кодона, всегда эквивалентны с точки зрения кодирующей специфичности; 2) A и G в третьем положении кодона эквивалентны часто, но не всегда; 3) пиримидиновые нуклеотиды (U или C) и пуриновые нуклеотиды (A или G) в третьем положении кодона иногда не эквивалентны (т. е. могут быть различимы). Основываясь на физических соображениях, Крик исключил возможность формирования пар А:G и G:A, поскольку такие взаимодействия приводят к дегидратации NH₂-группы гуанина, что невыгодно с энергетической точки зрения. Далее, учитывая особенности кодового словаря, упомянутые выше, он также исключил возможность спаривания U:U, U:C и C:U; если бы такое спаривание было позволено, пиримидиновые и пуриновые нуклеотиды в третьем положении были бы всегда эквивалентны, т. е. неразличимы, что не соответствует экспериментальным данным. Все эти соображе-

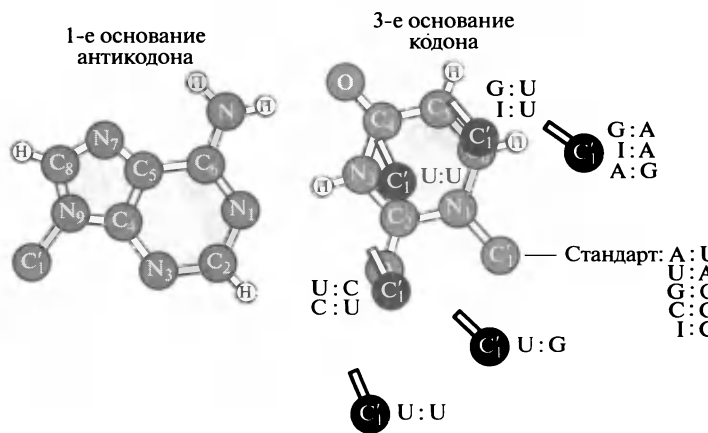


Рис. 9.1. Относительные положения и направления N-гликозидных связей нуклеотидных остатков при спаривании первого основания антикодона (*слева*) с третьим основанием кодона (*справа*).

Стандартная каноническая пара оснований А:U представлена серыми кружками атомов С, N и O (белые кружки — атомы H); кружки C₁ обозначают положение гликозидных углеродов рибозных остатков этих нуклеотидов. Если фиксировать положение гликозидного углерода антикодонного нуклеотида (C₁ слева) и направление его N-гликозидной связи, то гликозидный гидроксил кодонного нуклеотида (C₁ справа) и его N-гликозидная связь при канонических спариваниях U:A, G:C, C:G, а также I:C (где I — инозин), окажутся в стандартном положении, идентичном таковому в случае пары А:U. Положение гликозидного углерода кодонного нуклеотида и направление его N-гликозидной связи при иных спариваниях (G:U, I:U, U:U, G:A, I:A, A:G, U:C, C:U, U:G, U:U) обозначены черными кружками и соответствующими символами связей с жирными линиями (отклонения от стандартного положения — «wobble»).

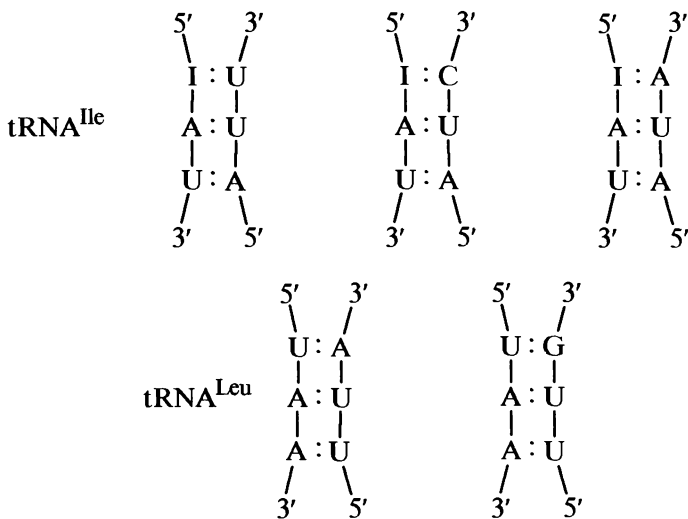
Crick (1966) *J. Mol. Biol.* 19: 548—555

ния были суммированы в следующих правилах спаривания между первым нуклеотидом антикодона и нуклеотидом в третьем положении кодона:

- A спаривается с U;
- G спаривается с C и U;
- I спаривается с C, U и A;
- U спаривается с A и G;
- C спаривается с G.

Когда эти правила были сформулированы, уже было известно, что I часто встречается в антикодонах тРНК, в то время как A в первой позиции антикодона не обнаруживается и, по-видимому, всегда превращается в I путем ферментативного дезаминирования. Типы нестрогого спаривания, предложенные Криком, в сравнении со стандартным спариванием, представлены на рис. 9.2.

Из правил Крика следовало, что ни одна аминокислота не может быть закодирована только одним кодоном с A, находящимся в третьем положении. Действительно, AUA вместе с AUU и AUG кодирует изолейцин, UUA и UUG кодируют лейцин, но UGA не кодирует никакой аминокислоты. Эти правила также предсказывали, что все три кодона для изолейцина могут быть узнаваемы одной тРНК с антикодоном IAU (позднее было доказано, что именно это и характерно для эукариот), а два кодона для лейцина, упомянутые выше (UUA и UUG), — одной тРНК, которая имеет антикодон UAA:



Далее, в соответствии с правилами гипотезы нестрогого соответствия I не может быть в антикодонах тРНК в случаях, когда соответствующая аминокислота кодируется только двумя кодонами. Другими словами, гипотеза предсказывала, что I никогда не может быть в первом положении антикодона фенилаланиновой, тирозиновой, цистеиновой, гистидиновой, глутаминовой, глутаминовой, аспартиловой и аспарагиновой тРНК.

Наконец, согласно гипотезе, когда аминокислота кодируется четырьмя кодонами, должно существовать не менее двух тРНК с различными антикодонами. Одна из этих тРНК может узнавать U и C, в то время как другая узнает A и G в третьем положении кодона (если в первом положении их антикодонов G и U со-

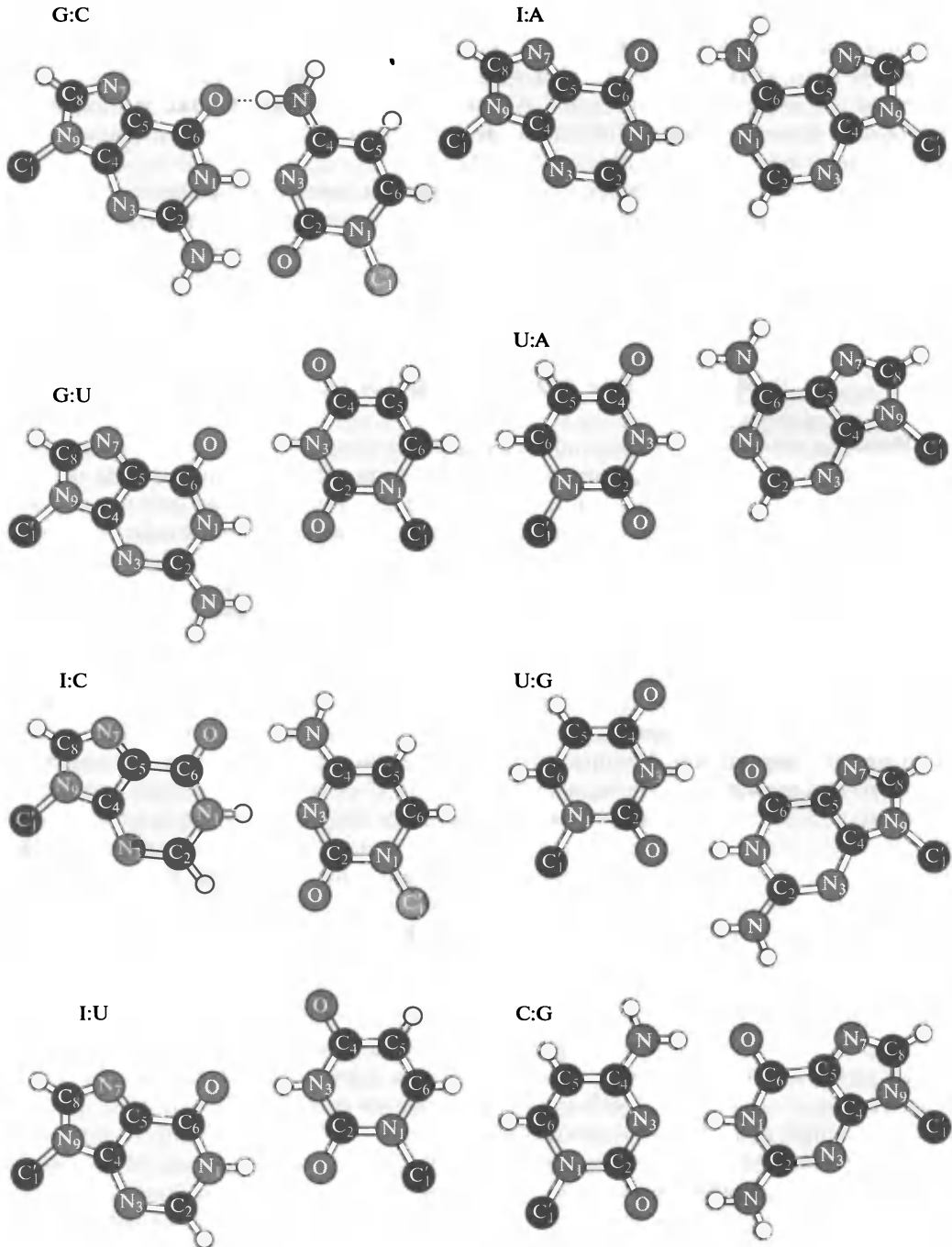


Рис. 9.2. Пары оснований, формирующиеся между нуклеотидными остатками в первом положении антикодона и третьем положении кодона при связывании аминокил-тРНК с мРНК в транслирующей рибосоме.

Черными кружками обозначены атомы углерода, серыми — электроотрицательные атомы кислорода и азота, белыми маленькими — атомы водорода

ответственно); позднее было показано, что такая ситуация типична для прокариот (исключая тРНК^{Arg} с ICG в качестве антикодона). Альтернативная возможность — одна тРНК узнает U, C и A, в то время как другая узнает только G в третьем положении кодона (если I и C находятся в первом положении их антикодонов); было показано, что это более характерно для кодон-антикодонного узнавания у эукариот (исключая тРНК^{Gly}).

Правила нестрогого соответствия стандартным (каноническим) спариваниям азотистых оснований между первым положением антикодона и третьим положением кодона, так же как и большая часть предсказаний, сделанных Криком (1966) на основе этой гипотезы, были подтверждены всей последующей совокупностью экспериментальных данных.

9.1.4. Уточнения правил нестрогого соответствия

Вместе с тем по мере накопления экспериментальных данных выявилась необходимость и некоторых уточнений правил нестрогого соответствия (см. обзор: Watanabe, K., and Osawa, S., 1995). Большая часть уточнений так или иначе связана с модификациями азотистых оснований в первом положении антикодона, для которого и характерно нестрогое соответствие (основание 34 тРНК, см. рис. 3.7). Во-первых, было обнаружено, что у большинства бактерий и в цитоплазме эукариот U в первом положении антикодона (U34) всегда модифицирован. Типичные модифицированные основания в этом положении тРНК — производные 5-метил-2-тиоуридина у прокариот, производные 5-гидроксиуридина у эукариот, производные 5-метилуридина у обоих надцарств организмов. Часто встречается также метилирование 2'-гидроксильной группы рибозы уридина в первом положении антикодона. Именно эти модификации и ограничивают узнавание третьего нуклеотида кодона таким образом, что U спаривается только с пуринами (A или G), а не со всеми четырьмя нуклеотидами. Оказалось, что в тех случаях, когда U в первом положении антикодона не модифицирован, как в ряде тРНК митохондрий, хлоропластов и у некоторых примитивных бактерий, например рода *Mycoplasma*, он узнает все четыре основания (A, G, U и C) в третьем положении кодона. Соответственно только один вид тРНК с антикодоном UNN в митохондриях, хлоропластах и у *Mycoplasma* служит для того, чтобы узнавать все четыре кодона в семействе кодонов. Например, тРНК^{Val} с антикодоном UAC узнает GUU, GUC, GUA и GUG, а тРНК^{Ala} с UGC в качестве антикодона узнает GCU, GCC, GCA и GCG. В случаях, когда нуклеотид в первом положении антикодона способен узнавать только пуриновые нуклеотиды в третьем положении кодона, U в митохондриальных видах тРНК также оказывается модифицированным.

У бактерий кодоны для изолейцина читаются двумя видами тРНК: одним с антикодоном GAU, способным узнавать кодоны AUC и AUU (в соответствии с классическими правилами нестрогого соответствия), и другим, специфически взаимодействующим с кодоном AUA. Таким образом, в качестве исключения из первоначальных правил нестрогого соответствия (см. ранее) здесь возникает ситуация, когда кодон, заканчивающийся A, читается отдельной тРНК. Оказалось, что в этом случае первое положение антикодона представлено специальной модификацией C — так называемым лизидином. В лизидине позиция 2 (O2) пиримидинового кольца замещена остатком лизина, т.е. он представляет собой 4-амино-2-(N⁶-лизино)-1-(β-D-рибофуранозил)пиримидиний.

В исходных правилах нестрогое соответствие предполагалось, что А, если он находится в первой позиции антикодона, будет спариваться только с U в третьем положении кодона. Однако А обычно не присутствует в этой позиции тРНК, а модифицирован (дезаминирован) в I. Тем не менее в некоторых редких случаях, таких как тРНК^{Arg} дрожжевых митохондрий и тРНК^{Thr} *Mycoplasma*, А был обнаружен в первой позиции антикодона. По-видимому, немодифицированный А в первом положении антикодона может читать все четыре нуклеотида (U, C, G и A) в третьем положении кодонов, а не только U, как было первоначально постулировано.

9.1.5. Стереохимия кодон-антикодонового спаривания

Структура антикодоновой петли, описанная в подразд. 3.2.2, характеризуется спиральной организацией отрезка цепи, включающего три нуклеотида антикодона и два остатка, следующих за антикодоном по направлению к 3'-концу. Параметры спирали близки к таковым для единичной цепи в стандартных двойных спиралях РНК. Ее основания находятся в стэкинге, а три основания, формирующие антикодон, ориентированы так, что группы, ответственные за спаривание путем формирования водородных связей, обращены наружу (см. рис. 3.6). Таким образом, антикодон готов к образованию двуспирального комплекса с комплементарной последовательностью без значительного изменения своей структуры.

Если смотреть на L-образную молекулу тРНК с наружной стороны угла, антикодоном вверх, то группы трех оснований антикодона, способных спариваться, повернуты несколько вправо от плоскости, в которой расположены обе ветви молекулы (см. рис. 3.7). Первое основание антикодона (положение нестрогого спаривания) оказывается на самой верхушке антикодоновой ветви, а два других основания антикодона и два последующих основания антикодоновой петли спускаются от первого основания по спирали вниз и направо, подобно винтовой лестнице.

Когда антикодон тРНК формирует комплекс с мРНК, образовавшийся двуспиральный участок (кодон-антикодоновый дуплекс) характеризуется стандартным (уотсон-криковским) спариванием снизу от вершины антикодоновой ветви и менее точным (нестрогим) спариванием на вершине. Последнее согласуется с большей пространственной свободой пары, расположенной на краю дуплекса, по сравнению с внутренними парами спирали. (В антикодон-кодоновом спаривании третья пара может быть также рассмотрена как внутренняя, поскольку ее конформационная свобода ограничена находящимся в стэкинге последующим пуриновым основанием антикодоновой петли, а также непосредственно примыкающим антикодоном молекулы пептидил-тРНК.) Естественно, что кодон мРНК, взаимодействующий с комплементарным антикодоном тРНК, должен также приобретать спиральную конформацию с антипараллельной ориентацией цепи, как в А-форме двойной спирали РНК.

Связывание аминокислот-тРНК с А-участком рибосомы во время элонгации предполагает, что Р-участок занят пептидил-тРНК. Когда тРНК переходит в Р-участок и находится в нем, кодон-антикодоновое взаимодействие между мРНК и тРНК сохраняется. Это подразумевает, что предыдущий триплет мРНК, смежный с кодоном, располагающимся в А-участке, также вовлечен в спаривание оснований и имеет спиральную конформацию. Таким образом, после связывания оче-

редной аминокислоты-тРНК в транслирующей рибосоме присутствуют два смежных кодон-антикодоновых дуплекса, однако они не коаксиальны и, следовательно, не находятся в стэкинг-взаимодействии друг с другом. Излом между ними обеспечивается гибким межнуклеотидным мостиком $C(3')-O-P-O-C(5')-C(4')$, связывающим два кодона мРНК.

9.1.6. Смыкание структурных блоков малой рибосомной субъединицы при кодон-антикодоновом взаимодействии

Как показали рентгеноструктурные исследования функциональных комплексов рибосомных частиц, кодон-антикодоновое спаривание при связывании аминокислоты-тРНК с *A*-участком на 30S субъединице сопровождается взаимодействием оснований A1492 и A1493 рибосомной спирали h44 (ее района, примыкающего к головке — см. рис. 8.13), а также G530 торцевой петли рибосомной спирали h18 с малым желобком кодон-антикодонового дуплекса (Рамакришнан и др., 2002). Такое взаимодействие может осуществиться геометрически только при образовании правильных нуклеотидных пар в первых двух положениях кодона; другими словами, эти взаимодействия участвуют в положительной дискриминации правильной геометрии кодон-антикодонового спаривания. Указанные взаимодействия основания спирали h44 и петли спирали h18 с кодон-антикодоновым дуплексом как бы стягивают вместе соответствующие структурные блоки 30S субъединицы, в результате чего головка субъединицы сближается с «плечом» (близлежащим вы-

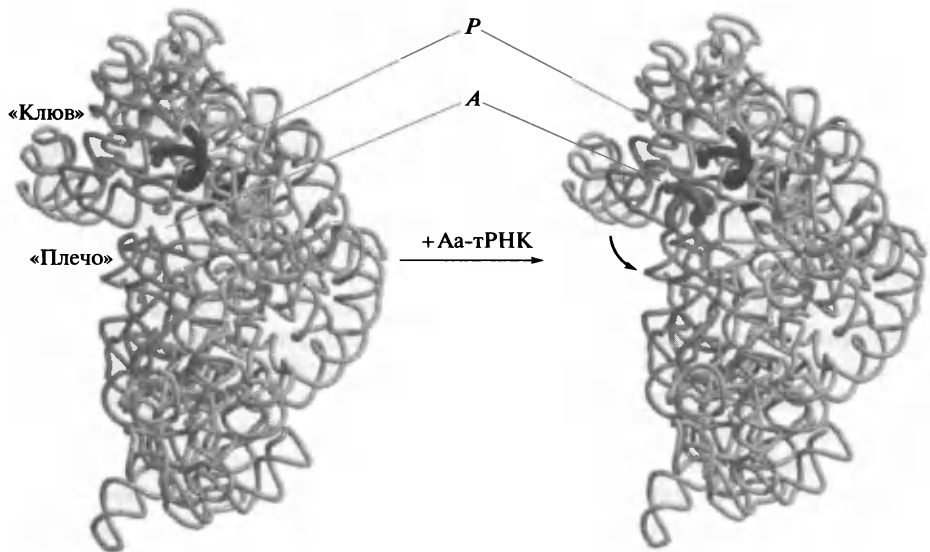


Рис. 9.3. Смыкание блоков 30S рибосомной субъединицы (сближение «клюва» головки и «плеча») при кодонзависимом связывании аминокислоты-тРНК в *A*-участке по данным рентгеноструктурного анализа.

30S рибосомная субъединица показана с ее контактирующей стороны. В эксперименте к 30S рибосомной субъединице, содержащей гексануклеотид в качестве матрицы и антикодоновую шпильку тРНК в *P*-участке, была добавлена антикодоновая шпилька, которая связывалась с *A*-участком субъединицы.

PDB ID 1N32. Ogle et al. (2002) *Cell* **111**: 721–732

ступом тела субъединицы), а они вместе становятся ближе к границе с большой субъединицей (рис. 9.3). Эти смещения, индуцированные правильным кодон-антикодоновым взаимодействием, производят эффект смыкания блоков малой субъединицы вокруг антикодоновой спирали тРНК, т.е. зажимают антикодоновую спираль тРНК в *A*-участке. Таким образом, малая рибосомная субъединица переходит от более открытой — разомкнутой — конформации к более закрытой — сомкнутой — в результате кодон-зависимого связывания аминоксил-тРНК.

9.2. Участие фактора элонгации 1 (EF-Tu или eEF1A) в связывании аминоксил-тРНК

У прокариот кодонзависимое связывание аминоксил-тРНК с *A*-участком рибосомы катализируется белком, называемым фактором элонгации Tu (EF-Tu); у эукариот соответствующий фактор называется eEF-1. Было предложено использовать универсальное название EF1A для прокариот и эукариот, с добавлением приставки «е» (*eukaryotic*) — eEFA1 — в случае эукариот. Белок связывает ГТФ и аминоксил-тРНК и входит в рибосому в составе тройственного комплекса аминоксил-тРНК•EF1A•GTP.

9.2.1. EF1A и его взаимодействия

Бактериальный EF1A (EF-Tu) — это белок с молекулярной массой около 45 кДа (393 и 405 аминокислотных остатков в случае *E. coli* и *Thermus thermophilus* или *T. aquaticus* соответственно), состоящий из трех структурных доменов (рис. 9.4). N-концевой домен (домен I, или G-домен) ответствен за связывание и гидролиз ГТФ. Он включает около 200 аминокислотных остатков. Структурно он похож на G-домены всех других G-белков (так называемое суперсемейство ГТФаз) и почти

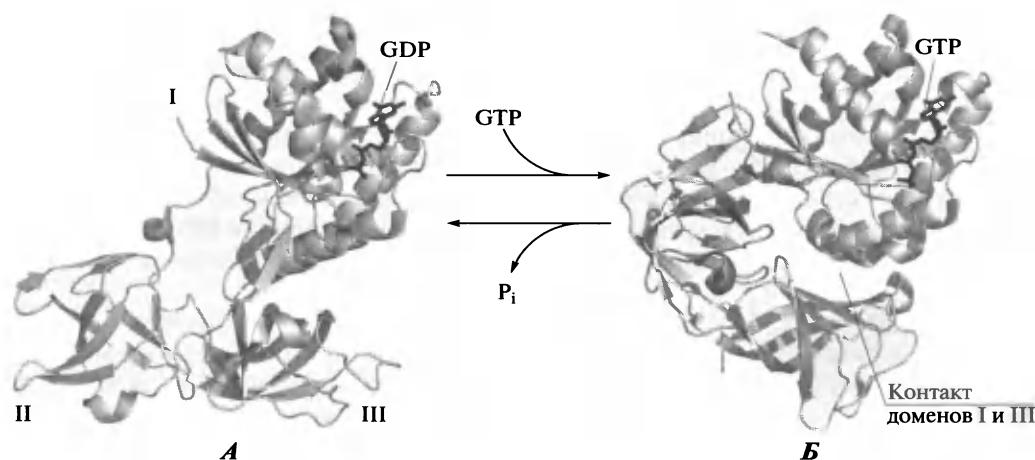


Рис. 9.4. Сравнение релаксированной (разомкнутой) формы EF-Tu (в комплексе с ГДФ или в свободном виде, *A*) и компактной (сомкнутой) формы EF-Tu (в комплексе с ГТФ, *Б*) по данным рентгеноструктурного анализа.

A: EF-Tu•GDP *E. coli*; PDB ID 1DG1. Abel et al. (1996) *Structure* **4**: 1153—1159.

Б: EF-Tu•GMP•PNP *E. coli*; PDB ID 1DG1. Parmeggiani et al. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**: 2893—2900

идентичен продукту протоонкогена *ras*, белку p21. Существенной типичной чертой этой структуры является нуклеотидсвязывающий мотив $\beta\alpha\beta$ — так называемая россмановская укладка (*Rossmann fold*), где α -спирали лежат на параллельном β -слое. Последовательность структурных элементов вторичной структуры всего этого домена EF-Tu — $\beta\alpha[\beta\leftrightarrow\alpha]\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\alpha$. Все шесть β -тяжей домена, с пятью параллельными тяжами и одним антипараллельным, уложены в один слегка скрученный слой, в то время как три α -спирали находятся на одной стороне слоя и обращены к домену III, а три других — на другой стороне β -слоя и обращены наружу. Участок, связывающий ГТФ, находится в области петель, соединяющих тяжи и спирали на наружной поверхности домена I. «Эффекторная петля» (остатки 40—60 — участок в квадратных скобках в вышеприведенной последовательности β - и α элементов) является областью с изменяемой конформацией ($\beta\leftrightarrow\alpha$); она расположена на краю β -слоя и прилегает к границе между доменами I и III. Полагают, что эффекторная петля со стабилизированной α -спиральной конформацией непосредственно взаимодействует с рибосомой.

Домены II и III (около 100 аминокислотных остатков каждый) состоят главным образом из антипараллельных β -тяжей, формирующих соответственно семитяжевую и шеститяжевую бочкообразные структуры этих доменов (см. рис. 9.4). Эти два домена находятся в тесном контакте и могут рассматриваться как единый структурный блок белка EF-Tu.

Как уже упоминалось, EF-Tu может связывать ГТФ или ГДФ на поверхности домена I. Однако конформации EF-Tu различаются в зависимости от того, какой нуклеотид связан — ГТФ или ГДФ. Когда связан ГДФ или на EF-Tu вообще отсутствует связанный нуклеотид, фактор находится в неактивной форме: он не может связывать аминоксил-тРНК и взаимодействовать с рибосомой. В этой неактивной форме EF-Tu характеризуется высокой степенью междоменной подвижности, т. е. рыхлой, релаксированной конформацией. В середине молекулы, между доменом I и парой доменов II/III, имеется полость, и между доменами I и III не наблюдается тесного контакта (см. рис. 9.4, *A*). Эффекторная петля не стабилизирована и находится в основном в конформации β -тяжа. Когда связывается ГТФ, две половинки белка (домен I и пара доменов II/III) поворачиваются относительно друг друга и тем самым сближаются, полость между ними исчезает и молекула становится более компактной. В результате этого белок переходит в плотную, компактную конформацию, а домены I и II входят в близкий контакт (см. рис. 9.4, *B*). При этом эффекторная петля стабилизируется дополнительными взаимодействиями и принимает частично α -спиральную конформацию (формируются две короткие α -спирали). Это — активное состояние EF-Tu: молекула способна к связыванию аминоксил-тРНК и затем к взаимодействию с рибосомой.

Бактериальный EF-Tu вместо нуклеотидов может взаимодействовать с другим белком, который имеет молекулярную массу около 30 кДа и обозначается как фактор элонгации Ts (EF-Ts), или EF1B. Образуется комплекс между EF-Tu и EF-Ts (EF1A•EF1B). Если EF-Tu связан с ГДФ, образование комплекса EF-Tu•Ts приводит к вытеснению ГДФ:



Конформация EF-Tu, связанного с EF-Ts, похожа на конформацию в комплексе EF-Tu•GDP или в свободном EF-Tu, т. е. представляет собой рыхлую неактивную форму EF-Tu. Молекула EF-Ts, имеющая удлиненную форму, взаимо-

действует как с доменом I, так и с доменом III фактора EF-Tu. Это взаимодействие индуцирует локальные изменения конформации в домене I белка EF-Tu, приводящие к разрушению ГДФ-связывающего участка и, таким образом, к освобождению ГДФ из комплекса.

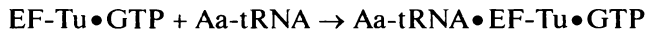
В присутствии избытка ГТФ комплекс EF-Tu•Ts способен взаимодействовать с ГТФ, в результате чего образуются комплекс EF-Tu•GTP и свободный EF-Ts:



Таким образом, EF-Ts (EF1B) является фактором, который вытесняет ГДФ из медленно диссоциирующего комплекса EF-Tu•GDP и тем самым катализирует обмен ГДФ. Суммарную реакцию можно записать так:



Свободный EF-Tu, так же как и комплексы EF-Tu•GDP и EF-Tu•Ts, не имеют должного сродства к аминоксил-тРНК. Только добавление ГТФ индуцирует возникновение сильного сродства между EF-Tu и аминоксил-тРНК, что приводит к образованию тройственного комплекса:

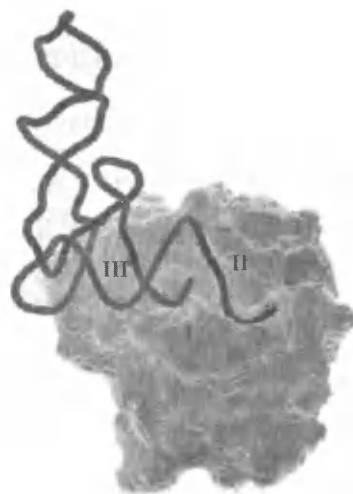


Связывание между аминоксил-тРНК и EF-Tu носит многоцентровый характер, и в нем участвуют все три домена EF-Tu. Компактная активная конформация EF-Tu не изменяется существенно при связывании аминоксил-тРНК. EF-Tu, связанный с аминоксил-тРНК, накрывает левую сторону акцепторного черешка и ТΨ-спираль L-образной молекулы тРНК (если на последнюю смотреть с наружной стороны ее угла, антикодоном вверх) (рис. 9.5). Домен III ответственен за связывание ТΨ-спирали аминоксил-тРНК. Он взаимодействует исключительно с рибозофосфатным остовом, контактируя с рибозой и фосфатными группами нуклеотидных остатков 52—54 и 63—65. Домен II образует карманы для удержания аминоксильного остатка, специфически связывая его свободную аминоксильную группу и сложноэфирную группу, а также 3'-концевой аденозин с его гидрофобным аденином и свободной 2'-ОН-группой. Однотяжевая 3'-концевая последовательность A73-C74-C75 молекулы аминоксил-тРНК связывается в щели, образован-

Рис. 9.5. Тройственный комплекс Aa-tRNA•EF-Tu•GTP. Структура комплекса дрожжевой Phe-tRNA^{Phe} с EF-Tu из *Thermus aquaticus* и аналогом ГТФ GMP-PNP была определена с помощью рентгеноструктурного анализа при разрешении 2,7 Å.

Молекула EF-Tu представлена в формате «surface», а Phe-тРНК — в формате «gibbon». Видно, что EF-Tu взаимодействует с левой стороной L-образной молекулы тРНК, если смотреть на тРНК с внешней стороны угла молекулы, антикодоном вверх (т.е. со стороны ТΨ-петли), и исключительно с ее ТΨ-акцепторной ветвью. Антикодоновая ветвь находится вне связи с фактором, будучи направлена от него в раствор. Акцепторный конец тРНК с аминоксильным остатком зажат в щели между доменами I и II, а ее 5'-конец в углублении между тремя доменами.

PDB ID 1TTT (1995). Nissen et al., *Science* 270: 1464—1472



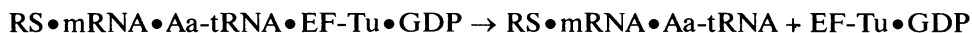
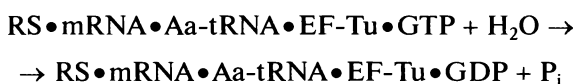
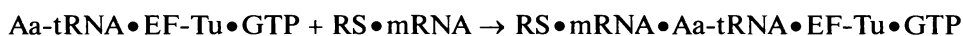
ной на границе между доменами I и II (см. рис. 9.5). Протяжения этой последовательности находятся в стэкинге и продолжают спиральную укладку акцепторной двойной спирали; они развернуты от белка, так что эта последовательность взаимодействует с эффекторной петлей (Lys52) домена I только своими фосфатами. Карман, связывающий 5'-конец аминоксил-тРНК, формируется на стыке всех трех доменов EF-Tu.

Для эукариотического EF1A (eEF1A) были описаны две формы: eEF1_L («легкий») и eEF1_H («тяжелый»). Фактор eEF1_L идентичен бактериальному EF1A (EF-Tu) и может рассматриваться как его полный аналог (и гомолог); это мономерный белок с молекулярной массой около 50 кДа, способный связывать ГТФ или ГДФ и формировать тройственный комплекс Aa-tRNA•EF1A•GTP. Фактор eEF1_H является агрегированным аналогом бактериального комплекса EF-Tu•Ts. Он состоит из eEF1A и эукариотического аналога EF1B (eEF1B), содержащего три субъединицы (α, β и γ) с молекулярными массами 25, 30 и 50 кДа. По-видимому, α- и β-субъединицы eEF1B играют роль аналога EF-Ts, в то время как роль большей γ-субъединицы не определена. Было обнаружено, что в клетках млекопитающих часть eEF1_H связана также с валил-тРНК-синтетазой.

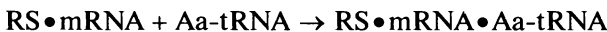
9.2.2. Связывание тройственного комплекса с рибосомой

Содержание EF-Tu (или eEF1A) в клетке высокое, и, в сущности, вся клеточная аминоксил-тРНК *in vivo* существует в виде тройственных комплексов с этим белком и ГТФ. Как тРНК, так и белковая часть комплекса характеризуются сродством к рибосоме. В результате кодон-антикодонного узнавания комплекс, который несет тРНК, соответствующую матричному кодону, продуктивно связывается с рибосомой. При этом белковая часть комплекса взаимодействует с факторсвязывающим центром большой рибосомной субъединицы в районе палочкообразного выступа (L7/L12-стержня) и его основания (см. подразд. 8.4).

Селективное связывание тройственного комплекса с рибосомой, обусловленное кодон-антикодонным взаимодействием, индуцирует гидролиз связанного ГТФ до ГДФ и ортофосфата, и ортофосфат освобождается. Именно правильная посадка остатка тРНК в A-участке 30S субъединицы индуцирует гидролиз ГТФ на рибосомосвязанном факторе. После этого EF-Tu (или eEF1A) существует уже в виде комплекса с ГДФ (EF-Tu•GDP), а поскольку такой комплекс больше не имеет сильного сродства к рибосоме и аминоксил-тРНК, он освобождается из рибосомы. Аминоксил-тРНК остается связанной в A-участке, а ее аминоксильный конец устанавливается в a-участке ПТЦ и становится способным реагировать с пептидил-тРНК (см. подразд. 8.3 и 8.5). Таким образом, можно написать следующую последовательность реакций (RS•mRNA — комплекс рибосомы с мРНК):



Следует отметить, что *in vitro* кодонзависимое связывание аминоксил-тРНК с *A*-участком рибосомы может происходить и в отсутствие EF-Tu или eEF1A. Такое *бесфакторное связывание* аминоксил-тРНК с рибосомой для его максимальной эффективности требует более высокой концентрации Mg^{2+} в среде (например, 10—15 мМ $MgCl_2$ в присутствии 100 мМ NH_4Cl или KCl в случае рибосом *E. coli*) по сравнению с концентрацией Mg^{2+} , достаточной для EF-Tu-зависимого связывания (5—10 мМ в случае бактериальной системы). Бесфакторное связывание функционально и продуктивно: связанная аминоксил-тРНК может участвовать в реакции транспептидации с пептидил-тРНК, находящейся в *P*-участке. Бесфакторное связывание аминоксил-тРНК отличается от EF-Tu-зависимого связывания тем, что происходит со значительно меньшей скоростью. Таким образом, в бесклеточной системе может происходить медленная спонтанная реакция селективного (кодонзависимого) комплексообразования:



Тем не менее окончательный результат этой реакции подобен тому, что наблюдается для быстрого связывания тройственного комплекса $Aa-tRNA \bullet EF-$

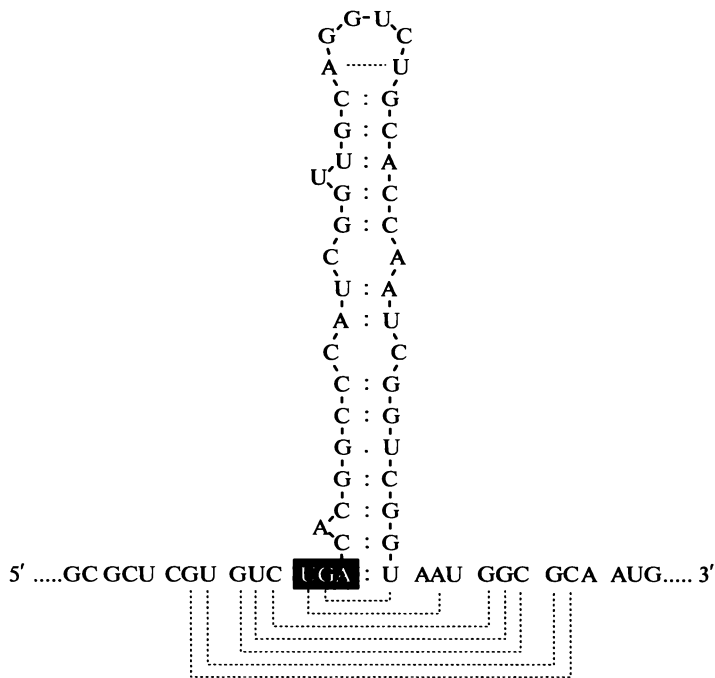


Рис. 9.6. Схема вторичной структуры узнающего модуля мРНК, кодирующей бактериальную (*E. coli*) форматдегидрогеназу, который определяет связывание селеноцистеинил-тРНК^{Sec} с кодоном UGA в *A*-участке рибосомы.

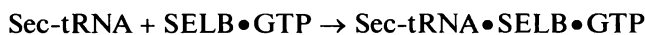
Верхняя половина шпильки, включая торцевую петлю и боковой выпетленный U, образует элемент третичной структуры, непосредственно ответственный за связывание фактора SELB. Нижняя часть представленной структуры, включая кодон UGA и прилегающую последовательность с 5'-стороны, образует искаженную двойную спираль с 3'-последовательностью у основания шпильки, которая также участвует в образовании комплекса с селеноцистеинил-тРНК^{Sec} и SELB.

Baron and Böck (1995) in *tRNA Structure, Biosynthesis, and Function* (eds. Söll and RajBhandary), pp. 529—544. ASM Press, Washington, D.C.

Hüttenhofer et al. (1996) *RNA* 2: 354—366

Tu•GTP с последующим распадом ГТФ и освобождением EF-Tu. Следовательно, белок EF-Tu (eEF1A) должен рассматриваться лишь как *ГТФ-зависимый катализатор* связывания аминоксил-тРНК с рибосомой.

Особого рассмотрения требуют специальные случаи, когда связывание тройственного комплекса с рибосомой строго зависит от локальной вторичной и третичной структур определенного района мРНК. Такая ситуация реализуется в случаях UGA-кодируемого связывания селеноцистеинил-тРНК^{Sec} (см. подразд. 3.5.3). У прокариот селеноцистеинил-тРНК^{Sec} образует тройственный комплекс не с EF-Tu и ГТФ, а с уникальным фактором элонгации SELB и ГТФ:



SELB специфически взаимодействует со структурным элементом мРНК длиной 40 нуклеотидов, расположенным непосредственно после кодона UGA (рис. 9.6). Таким образом, тройственный комплекс оказывается закрепленным на мРНК в специфическом участке, кодирующем селеноцистеин (рис. 9.7). Когда транслирующая рибосома наталкивается на этот тройственный комплекс, сидя-

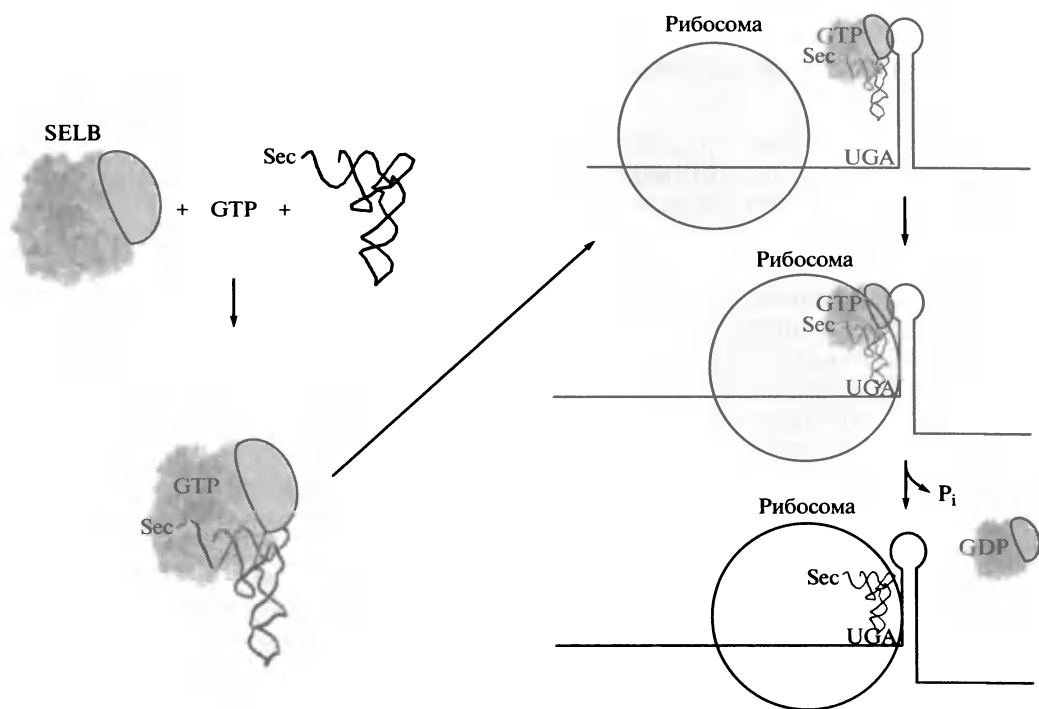


Рис. 9.7. Схема процесса включения селеноцистеина в растущую полипептидную цепь бактериального селеноцистеин-содержащего белка.

Специальный фактор элонгации SELB (аналог и гомолог EF-Tu) образует тройственный комплекс с ГТФ и селеноцистеинил-тРНК^{Sec} (слева). Тройственный комплекс Sec-tRNA•SELB•GTP связывается с узнающим модулем мРНК, располагающимся с 3'-стороны от кодона UGA (см. рис. 9.6). Транслирующая рибосома надвигается на этот четырехкомпонентный комплекс, в результате чего кодон UGA вместе с тройственным комплексом Sec-tRNA•SELB•GTP оказывается в А-участке рибосомы, в положении А/Т. Индуцированный рибосомой гидролиз ГТФ освобождает фактор SELB из рибосомы, и селеноцистеинил-тРНК занимает положение А/а, компетентное для прохождения реакции транспептидации с пептидил-тРНК (справа)

ший на мРНК, она принимает селеноцистеинил-тРНК^{Sec} в *A*-участок с установленным там UGA кодоном. Последующие события происходят таким же путем, как и в случае связывания стандартного тройственного комплекса: ГТФ гидролизует, комплекс SELB•GDP освобождается из рибосомы, и селеноцистеинил-тРНК реагирует с пептидил-тРНК, образуя очередную пептидную связь. Рибосома продолжает трансляцию мРНК.

У эукариот UGA-кодируемое включение селеноцистеина определяется специальным структурным элементом, расположенным в 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) мРНК, далеко вдоль цепи от кодона UGA. Этот структурный элемент значительно длиннее, чем таковой у прокариотических мРНК, и характеризуется своеобразной вторичной и третичной структурами. Механизм, с помощью которого данная локальная структура, расположенная в 3'-нетранслируемой области, влияет на специфичность связывания далеко отстоящего триплета UGA, расположенного внутри кодирующей области, не известен. Остается лишь предполагать, что в транслирующей полисоме 3'-нетранслируемая область мРНК может вступать в специфические контакты с определенными внутренними участками кодирующей последовательности.

9.2.3. Роль ГТФ и его гидролиза в катализе связывания аминоксил-тРНК

Бактериальный EF-Tu, как и эукариотический eEF1A, способен взаимодействовать с негидролизующим аналогом ГТФ, таким как GMP-PCP или GMP-PNP (см. рис. 8.8), и в результате этого взаимодействия, как и в случае с ГТФ, белок приобретает сродство к аминоксил-тРНК. Белок, негидролизующий аналог ГТФ и аминоксил-тРНК образуют тройственный комплекс, который, как и нормальный тройственный комплекс с ГТФ, способен связываться с рибосомой. Однако следующая реакция — гидролитическое разрушение эффектора (в норме — ГТФ) — не происходит. Таким образом, EF-Tu продолжает сохранять свое сродство к аминоксил-тРНК и рибосоме, и аминоксил-тРНК остается на рибосоме в комплексе с EF-Tu и негидролизующим аналогом ГТФ. В этом случае аминоксил-тРНК не может служить акцепторным субстратом в транспептидазной реакции с пептидил-тРНК, и, следовательно, следующая стадия цикла элонгации оказывается блокированной.

Действительно, когда тройственный комплекс Aa-tRNA•EF-Tu•GTP или Aa-tRNA•EF-Tu•GMP-PCP ассоциирует с рибосомой и связывается с матричным кодоном через антикодон тРНК, аминоксил-тРНК находится на связанном с рибосомой EF-Tu и не может взаимодействовать с пептидилтрансферазным центром (ПТЦ) большой субъединицы. Только после гидролиза ГТФ и ухода EF-Tu•GDP из рибосомы акцепторный конец с его аминоксил-тРНК тройственного комплекса не может полностью занять *A*-участок до тех пор, пока ГТФ не подвергнется гидролизу и EF-Tu не освободится. Так как тРНК тройственного комплекса располагается на малой субъединице в ее *A*-участке, а акцепторный конец этой тРНК связан в междоменном участке рибосомосвязанного EF-Tu (см. рис. 9.5), но еще не на *a*-участке 50S субъединицы, это состояние промежуточного кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК может быть названо промежуточным («гибридным») *A/T*-состоянием (см. подразд. 8.5.4 и рис. 8.15, *A*). Когда используется негидролизующий аналог ГТФ, аминоксил-

тРНК так и застревает в промежуточном A/T -положении и, таким образом, не может реагировать с пептидил-тРНК. Из этого можно было бы заключить, что гидролиз ГТФ энергетически обеспечивает перенос аминоксил-тРНК из положения A/T в положение A/a (см. рис. 8.15, **Б**).

В то же время аминоксил-тРНК, связанная с рибосомой в присутствии EF-Tu и негидролизуемого аналога ГТФ, такого как GMP-PCP, может быть переведена в активное для транспептидации состояние просто путем удаления EF-Tu и аналога ГТФ из рибосомы с помощью их механического отмывания. В таком случае, хотя аминоксил-тРНК также переносится из положения A/T в положение A/a , гидролиз ГТФ оказывается не вовлеченным в этот процесс. С другой стороны, было показано, что гидролиз ГТФ сам по себе не может обеспечить перенос аминоксил-тРНК в положение A/a , если EF-Tu после гидролиза ГТФ остается на рибосоме в присутствии кирромицина — антибиотика, который увеличивает сродство EF-Tu • GDP к рибосоме (см. подразд. 9.3.3).

Из общих соображений следует, что поскольку аккомодация аминоксил-тРНК в A -участке рибосомы представляется термодинамически спонтанным процессом (на что указывает возможность продуктивного бесфакторного связывания аминоксил-тРНК — см. подразд. 9.2.2), никакой дополнительной энергии для выполнения полезной работы в ходе этого процесса не требуется. Приходится заключить, что гидролиз ГТФ во время связывания аминоксил-тРНК используется исключительно для катализа процесса. Если EF-Tu рассматривать как катализатор связывания аминоксил-тРНК с рибосомой, то будет позволительным использовать концепцию *переходного состояния*, аналогичного переходному состоянию в ферментативном катализе. Тогда EF-Tu • GTP как белковый катализатор типа фермента должен иметь сродство именно к переходному состоянию комплекса аминоксил-тРНК • рибосома. Однако в отличие от ферментативного катализа ковалентной реакции, где энергия распада переходного состояния и освобождения катализатора обеспечивается самой катализируемой реакцией, EF-Tu использует разрушаемый эффектор, ГТФ: сначала ГТФ индуцирует сродство EF-Tu к переходному состоянию комплекса аминоксил-тРНК • рибосома, а затем ГТФ гидролизуется, EF-Tu освобождается, и переходное состояние превращается в состояние продукта. Возможно, такой путь использования нуклеозидтрифосфатов является общим правилом для катализа нековалентных реакций, таких как конформационное изменение или направленное молекулярное перемещение; катализ такого рода должен требовать параллельной ковалентной реакции типа гидролиза АТФ или ГТФ, для того чтобы компенсировать энергию сродства катализатора к переходному состоянию и тем самым завершить катализируемый процесс.

Таким образом, кодонзависимое связывание аминоксил-тРНК с A -участком рибосомы катализируется белком EF-Tu в комплексе с ГТФ. Катализ, очевидно, является результатом, во-первых, связывания ГТФ-активированного белка EF-Tu, удерживающего аминоксил-тРНК, с рибосомой, которое приводит к установке переходного состояния рибосомного комплекса, и, во-вторых, последующего гидролиза связанного ГТФ и освобождения EF-Tu, приводящего к достижению конечного — продуктивного — состояния. Значение гидролиза ГТФ состоит в разрушении эффектора (ГТФ). Как следствие гидролиза ГТФ, EF-Tu изменяет свою конформацию, теряет сродство к рибосомному комплексу и диссоциирует, что позволяет достичь конечного связывания аминоксил-тРНК с A -участком. Свободная энергия гидролиза ГТФ диссипирует в тепло.

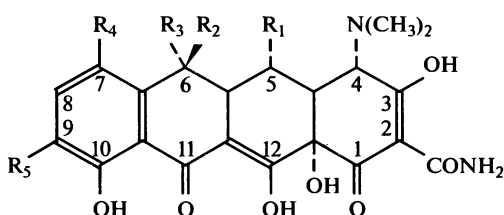
9.3. Ингибиторы связывания аминоктил-тРНК

Известны многочисленные специфические ингибиторы, преимущественно антибиотики, которые избирательно блокируют различные стадии рибосомного цикла элонгации. Большинство из них действуют селективно либо на рибосомы бактерий, либо на рибосомы эукариотических организмов (см. обзоры: Pestka, S., 1977; Gale, E. F., et al., 1981; Cundliffe, E., 1980, 1981). Стадия кодонзависимого связывания аминоктил-тРНК с рибосомой является прямой мишенью двух групп антибиотиков — тетрациклинов и аминогликозидов. Кроме того, некоторые антибиотики, а также растительные и грибные белковые токсины атакуют факторы элонгации или факторсвязывающий центр большой рибосомной субъединицы, что так или иначе может приводить к ингибированию стадии связывания аминоктил-тРНК.

9.3.1. Тетрациклины

Классический пример подавления белкового синтеза путем специфического ингибирования связывания аминоктил-тРНК с *A*-участком бактериальной 70S рибосомы — действие тетрациклинов (рис. 9.8). Тетрациклины ингибируют также кодонзависимое связывание аминоктил-тРНК с изолированной 30S субъединицей. Соответственно участок специфического связывания тетрациклина обнаруживается именно на 30S субъединице.

Заслуживает внимания тот факт, что в присутствии тетрациклина тройственный комплекс $Aa-tRNA \bullet EF-Tu \bullet GTP$ взаимодействует с 70S рибосомой и, видимо, занимает нормальную *A/T*-позицию с участием кодон-антикодонного узнавания. Далее, как и в норме, ГТФ претерпевает гидролиз, и $EF-Tu \bullet GDP$ освобождается, но аминоктил-тРНК не остается связанной в *A*-участке и тоже выпадает из рибосомы. В то же время аминоктил-тРНК, предварительно связан-



Тетрациклины	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Тетрациклин	—	ОН	СН ₃	—	—
Окситетрациклин	ОН	ОН	СН ₃	—	—
Хлортетрациклин	—	ОН	СН ₃	Сl	—
Миноциклин	—	—	—	N(CH ₃) ₂	—
ДМГ-миноциклин	—	—	—	N(CH ₃) ₂	NHCOCH ₂ N(CH ₃) ₂
ДМГ-деметилдезокситетрациклин	—	—	—	—	NHCOCH ₂ N(CH ₃) ₂

Рис. 9.8. Тетрациклины

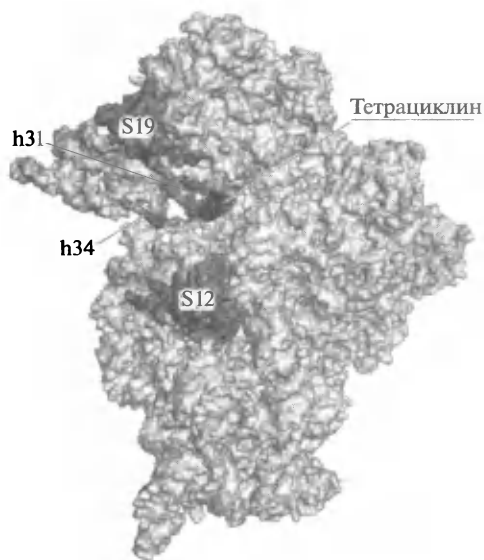


Рис. 9.9. Локализация участка связывания тетрациклина на контактирующей поверхности 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

Тетрациклин связан в основном водородными связями с сахарофосфатным остовом спирали h34, а также h31, в непосредственной близости к антикодоновой шпильке тРНК, установленной в А-участке. При переходе аминоацил-тРНК из промежуточного положения *A/T* в окончательную позицию *A/a* после гидролиза ГТФ и ухода EF-Tu он создает помеху происходящему конформационному изменению кодон-антикодонного комплекса и таким образом способствует диссоциации аминоацил-тРНК из А-участка рибосомы.

PDB ID 1HNW. Brodersen et al. (2000) *Cell* **103**: 1143—1154

ная с А-участком (в *A/a*-положении), препятствует связыванию тетрациклина с рибосомой. Таким образом, тетрациклин и аминоацил-тРНК как бы конкурируют за связывание с А-участком рибосомы, но только при *A/a*-положении аминоацил-тРНК.

Изучение места специфического связывания тетрациклина на 30S субъединице с помощью рентгеноструктурного анализа (Рамакришнан и др., 2000) показало, что молекула антибиотика сидит вплотную к району А-участка, где располагается антикодоновая петля аминоацил-тРНК. Антибиотик связывается своим гидрофильным краем (нижний край молекулы на рис. 9.8) с сахарофосфатным остовом рибосомной 16S РНК в малом желобке спирали h34 (рис. 9.9 и рис. 9.11 цв. вкл.) в основном водородными связями между атомами кислорода тетрациклина и атомами кислорода фосфатов РНК (остатки 1046—1067/1211—1189). Дополнительные взаимодействия возникают между антибиотиком и шпилькой h31 (остатки 960—975).

Ни с какими рибосомными белками, в том числе вблизи расположенными S12 и S19, тетрациклин не взаимодействует. Связанный тетрациклин оказывается прямо над антикодоновой шпилькой тРНК в А-участке. Аминоацил-тРНК в положении *A/T*, по-видимому, не сталкивается с сидящей рядом молекулой тетрациклина, но, как предполагается, при переходе в положение *A/a* (после ухода EF-Tu • GDP) перемещение акцепторного конца тРНК в ПТЦ 50S субъединицы заставляет тРНК несколько повернуться, в результате чего антикодоновая шпилька натывается на жесткую молекулу связанного тетрациклина; следовательно, в такой ситуации акцепторный конец не может быть фиксирован в ПТЦ, и аминоацил-тРНК диссоциирует.

Поскольку классические тетрациклины, такие как незамещенный тетрациклин, хлортетрациклин и окситетрациклин (см. рис. 9.8), обладают относительно низкими константами связывания с 30S субъединицей, ингибиторный эффект на рибосому сильно зависит от их концентрации в среде, а также от концентрации конкурирующей аминоацил-тРНК. Производные тетрациклина нового поколения, такие как миноциклин, имеют значительно более высокое сродство к рибо-

соем и соответственно оказывают более сильное ингибирующее действие (или требуются в более низких концентрациях). Особенно высокое сродство к рибосомам придает антибиотику наличие диметилглицильной группы в положении 9 (так называемые диметилглицилциклины, или DMG-тетрациклины, см. рис. 9.8). Такие тетрациклины очень эффективны как ингибиторы бактериальных рибосом и могут преодолевать устойчивость к тетрациклину у многих резистентных к нему штаммов.

Устойчивость бактерий к тетрациклинам может обеспечиваться двумя различными механизмами. Один из них — появление в цитоплазматической мембране транспортной системы, которая выкачивает антибиотик из клетки. Тетрациклины с высоким сродством к рибосомам могут преодолевать этот тип устойчивости благодаря их эффективности при низких концентрациях. Другой механизм, обеспечивающий устойчивость к тетрациклинам, возникает на уровне рибосом: в клетке появляется специфический белок, называемый Tet(M), или Tet(O), или Tet(S) (в зависимости от устойчивого штамма, в котором белок идентифицирован); он взаимодействует с бактериальной рибосомой ГТФ-зависимым способом и удаляет из нее связанный тетрациклин. Интересно, что белок является гомологом бактериального EF-G, рибосомной транслоказы (см. подразд. 11.2.1), и удаление тетрациклина из рибосомы сопровождается гидролизом ГТФ. Можно предполагать, что именно транслокационный механизм рибосомы с участием этого гомолога EF-G ответственен за удаление антибиотика из смежного с A-участком района рибосомы.

Другими словами, механизмом защитного действия белка Tet(M) и других родственных ему белков может быть ГТФ-зависимая транслокация тетрациклина из области A-участка рибосомы. Однако производные тетрациклинов с высоким сродством не могут быть удалены из бактериальной рибосомы с помощью такого механизма.

Было несколько сообщений об ингибиторном эффекте тетрациклинов на синтез белка у эукариот. Эти сообщения были основаны на экспериментах *in vitro*, в которых антибиотик в высоких концентрациях добавляли к бесклеточной эукариотической системе. Однако тетрациклин является сильным Mg^{2+} -связывающим агентом, так что ингибирование может быть результатом удаления Mg^{2+} из системы, а не специфическим действием антибиотика на эукариотические рибосомы. Действительно, при повышенной концентрации Mg^{2+} в эукариотической бесклеточной системе ингибирования тетрациклином не наблюдается.

9.3.2. Аминогликозиды

Другая группа антибиотиков — так называемые аминогликозиды — также влияет на связывание аминоацил-тРНК с A-участком рибосомы, но их действие имеет совершенно иную природу. К этой группе относятся стрептомицин (рис. 9.10), неомицин, канамицин и гентамицин (рис. 9.11), а также гигромицин, паромомицин и др. Антибиотики этой группы тоже связываются с 30S субъединицей вблизи A-участка, но, в отличие от тетрациклинов, способствуют удержанию аминоацил-тРНК в A-участке, в том числе удержанию «не своей» аминоацил-тРНК, т.е. аминоацил-тРНК, которая не соответствует кодону, расположенному в A-участке (Горини и др., 1964; Дейвис и др., 1965; Горини, 1974). Такое ложное кодирование приводит к синтезу неправильных полипептидов, характеризующихся

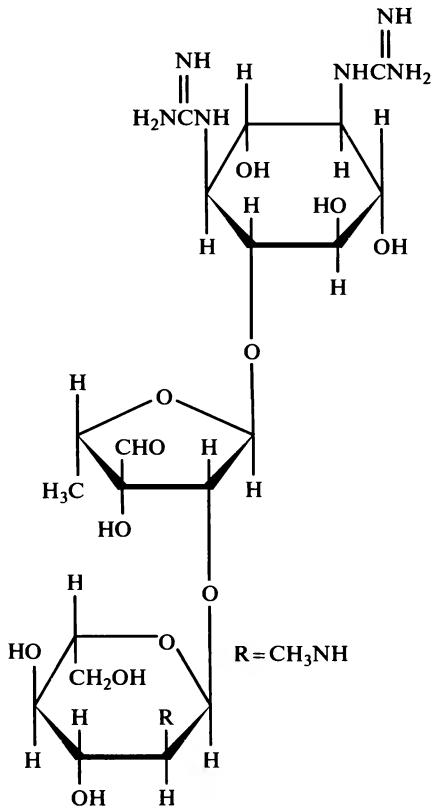


Рис. 9.10. Стрептомицин

цв. вкл.; см. также Ноллер и др., 1990; Пирохит и Стерн, 1994; Пуглиси и др., 1996). Взаимодействия некоторых аминогликозидов, например гигромицина, могут ограничиваться только указанным участком спирали h44, причем только контактами (водородными связями) антибиотика с азотистыми основаниями в большом желобке спирали. Другие аминогликозидные антибиотики могут образовывать контакты с сахарофосфатным остовом обеих цепей того же участка спирали h44, а также дополнительно взаимодействовать с близлежащими участками других спиралей. Так, паромомицин и гентамицин связываются тоже только в большом желобке спирали h44, но взаимодействуют как с азотистыми основаниями, так и с сахарофосфатным остовом обеих цепей 16S рРНК. Неомицин, связываясь в основном со спиралью h44, дополнительно взаимодействует с торцевой петлей спирали h18. Стрептомицин, одной своей частью (стрептидиновым кольцом, верхнее на рис. 9.10) связываясь с сахарофосфатным остовом того же верхнего участка спирали h44, другими своими кольцами дополнительно взаимодействует с торцевой петлей спирали h18, а также с участками сахарофосфатного остова спиралей h1 и h28; кроме того, этот антибиотик образует солевую и водородные связи с лизином 45 рибосомного белка S12. Некоторые аминогликозидные антибиотики взаимодействуют также со шпилькой H69 домена IV 23S рРНК, участвующей в формировании контакта между субъединицами, и тем самым стабилизируют ассоциацию рибосомных субъединиц.

большим количеством замен аминокислотных остатков, т.е. ошибок, с последующим цитотоксическим или бактерицидным эффектом этих полипептидов на клетки. Некоторые из аминогликозидов, как, например, стрептомицин, специфически действуют на бактериальные 70S рибосомы, в то время как канамицин, неомицин, гигромицин и ряд других могут атаковать также и эукариотические 80S рибосомы. Другим проявлением действия многих аминогликозидных антибиотиков, обусловленным тем же эффектом задержания тРНК в А-участке, может быть ингибирование транслокации (см. подразд. 11.6.1).

Многочисленные эксперименты по химическим сшивкам, защите нуклеотидов 16S рРНК от химической модификации и мутагенезу 16S рРНК, а затем и прямой рентгеноструктурный анализ комплексов 30S субъединицы с аминогликозидными антибиотиками показали, что местом связывания данных антибиотиков является район «шеи» малой субъединицы, т.е. область вблизи декодирующего центра (см. подразд. 8.2), и основной элемент структуры 16S рРНК, с которым взаимодействуют аминогликозиды, — это примыкающая к головке, т.е. самая верхняя, часть спирали h44 (нуклеотиды 1400—1410/1500—1490) (рис. 9.12 и рис. 9.1V

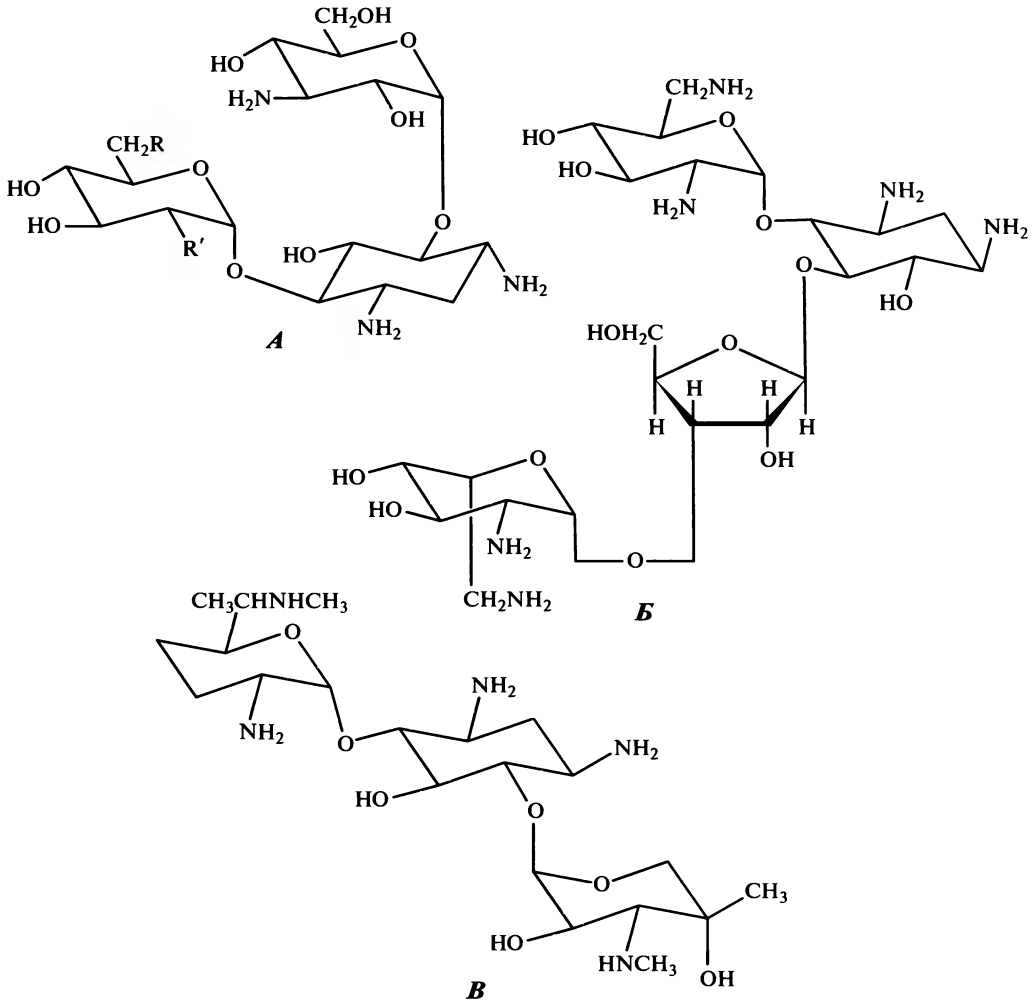
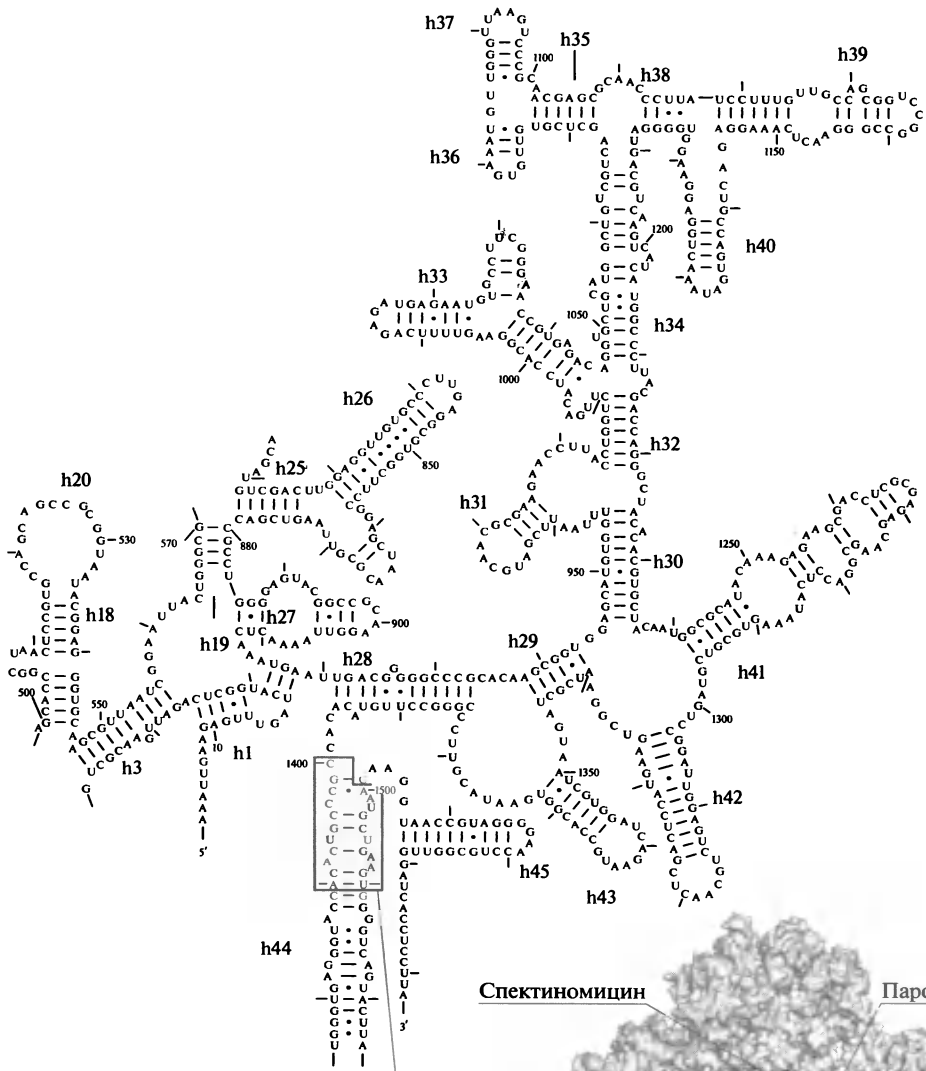


Рис. 9.11. Аминогликозидные антибиотики.

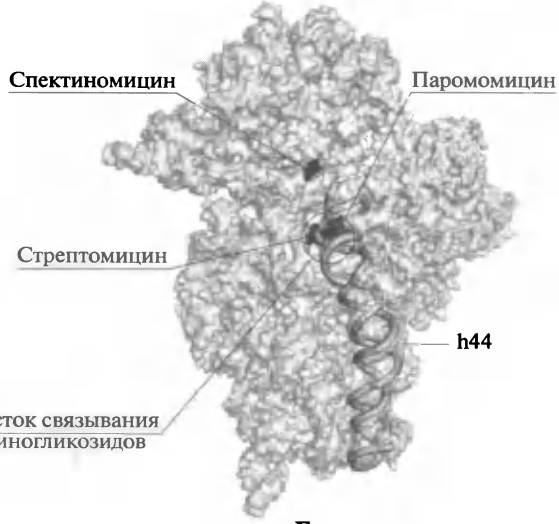
A: канамицин. *Б:* неомицин. *В:* гентамицин

Исходя из анализа взаимодействий аминогликозидных антибиотиков с 16S рРНК, имеются все основания полагать, что механизм их действия на рибосомы заключается в преимущественной стабилизации сомкнутой (более закрытой) конформации вокруг А-участка малой субчастицы (см. подразд. 9.1.6). Это означает, что связанный аминогликозид сдвигает равновесие между разомкнутой (открытой) и сомкнутой (закрытой) конформациями в сторону сомкнутой и тем самым повышает сродство аминоацил-тРНК к А-участку (Рамакришнан и др., 2000, 2002). Следовательно, путем стабилизации сомкнутого состояния аминогликозиды увеличивают вероятность связывания и удержания аминоацил-тРНК с «не своим» антикодоном, т. е. повышают уровень ложного кодирования.

Хорошо известны мутации рибосомного белка S12, которые придают бактериальным рибосомам устойчивость против стрептомицина и некоторых других аминогликозидов. При этом стрептомицинустойчивые мутации в белке S12 не приводят к нарушению его связи с антибиотиком. Мутации того же белка могут быть



A



Б

Рис. 9.12. Локализация участков связывания аминокликозидных антибиотиков и спектромицина на схеме вторичной структуры района 16S рРНК, участвующего в формировании тРНК-связывающих участков — домена III с прилегающими спиралями домена I и 3'-концевыми шпильками h44 и h45, (А) и на контактирующей поверхности 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа (Б).

PDB ID 1FJG. Carter et al. (2000) *Nature* 407: 340—348

←

ответственны и за стрептомицинзависимые фенотипы. Характерная особенность стрептомицинустойчивых рибосом состоит в том, что в отсутствие стрептомицина они отличаются от нормальных, немутантных рибосом повышенной точностью и замедленной скоростью трансляции. Объяснение этого факта может быть дано в рамках концепции равновесия между разомкнутым и сомкнутым состояниями А-участка на малой субъединице: мутации рибосомного белка S12 дестабилизируют сомкнутую конформацию этого участка. Действительно, белок S12 стабилизирует тот же район структуры 16S рРНК (основание спирали h44 — верхушка спирали h18 — спираль h27 с примыкающими остатками A913-A914), что и стрептомицин. Отсюда вполне логично вытекает, что мутации белка S12 нарушают его стабилизирующую функцию и тем самым сдвигают равновесие в сторону разомкнутой конформации, в результате чего аминоацил-тРНК хуже удерживается в А-участке, а следовательно, рибосома становится точнее. Некоторые мутации настолько сильно дестабилизируют сомкнутую конформацию, что рибосома вообще не может удерживать аминоацил-тРНК, и тогда связывание стрептомицина, стабилизирующего сомкнутую конформацию, оказывается «спасительным»; это — стрептомицинзависимый фенотип.

В соответствии с вышесказанным устойчивость к стрептомицину (или зависимость от него) и другим аминокликозидным антибиотикам может быть вызвана также и мутациями в самой 16S рРНК, которые нарушают структуру и взаимодействия в районе основания спирали h44 (например, мутации C1409G, G1491A, C, U или U1495C), верхушки спирали h18 и спирали h27 с примыкающим участком C912-A913-A914 (например, мутация C912U). В этих случаях сдвиг конформационного равновесия в сторону более рыхлой, т. е. разомкнутой, конформации как результат нарушения взаимодействий становится еще более очевидным, и здесь стрептомицин или другой аминокликозид уже не вызовет чрезмерного смыкания, ведущего к высокому ложному кодированию.

9.3.3. Некоторые непрямые ингибиторы

Имеется несколько известных ингибиторов, которые подавляют главным образом EF-Tu-промотируемое связывание аминоацил-тРНК с рибосомой путем блокирования факторсвязывающего участка на 50S субъединице рибосомы. Антибиотик тиострептон (рис. 9.13) представляет собой типичный пример ингибитора такого действия. Крупная молекула этого антибиотика прочно связывается с 50S субъединицей в области основания палочкообразного выступа L7/L12 и препятствуют взаимодействию EF-Tu (а также и EF-G) с факторсвязывающим центром. Было показано, что белок L11 как-то вовлечен в связывание тиострептона, а рибосомы, у которых отсутствует белок L11, функционально активны и не чувствительны к антибиотикам. В то же время сам белок L11, как оказалось, не связывает

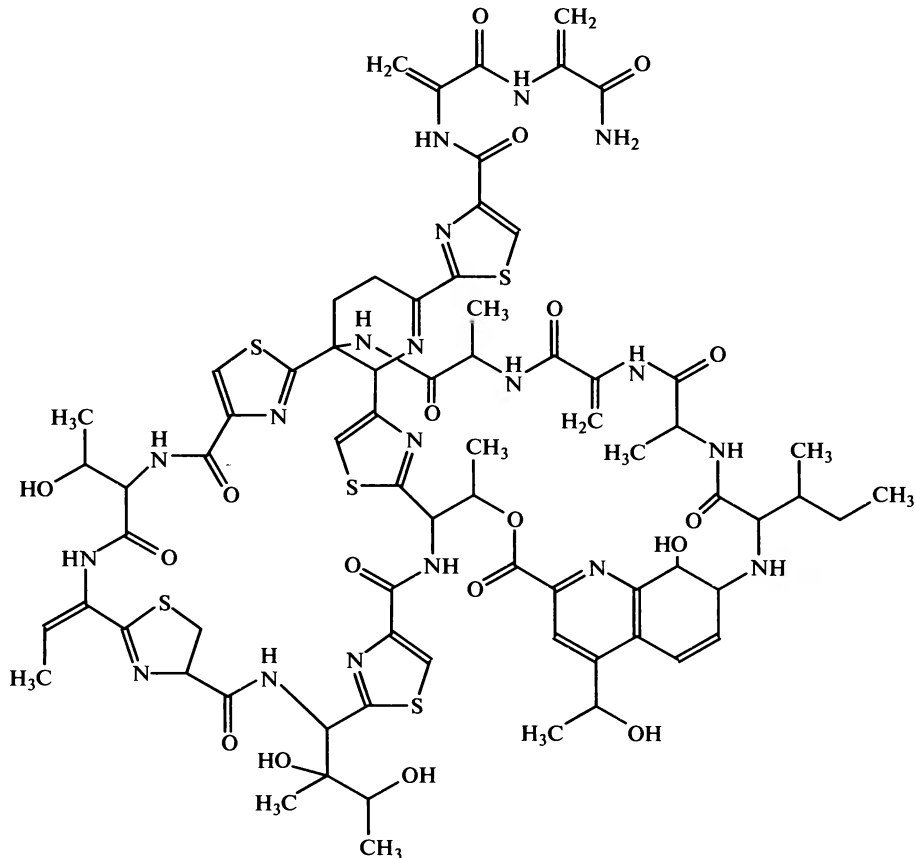


Рис. 9.13. Тиострептон

тиострептон. Участок связывания тиострептона был идентифицирован в домене II 23S рРНК (остатки 1060 — 1100, см. рис. 6.2), непосредственно на факторсвязывающей трехходовой спиральной структуре (H42-H43-H44), являющейся также местом связывания белка L11 и комплекса белков L10•(L7/L12)₄, т.е. прямо на так называемой «ГТФазной области» большой рибосомной субъединицы (см. подразд. 8.4). Роль белка L11, придающего рибосоме чувствительность к тиострептону, состоит, очевидно, лишь в стабилизации специфической локальной конформации РНК, необходимой для связывания антибиотика.

Белковые ингибиторы (токсины) из растений и грибов, такие как ризин и α-сарцин, инактивируют другую факторсвязывающую область рРНК большой субъединицы, так называемую ризин-сарциновую петлю домена VI (район нуклеотидных остатков, соответствующих, т.е. эквивалентных, нуклеотидам 2653 — 2667 шпильки H95 в 23S рРНК *E. coli*, см. рис. 6.2 и подразд. 8.4, рис. 8.10). Они действуют только на эукариотические рибосомы. Инактивация петли, связывающей фактор, происходит в результате очень специфической ферментативной атаки белка на этот локальный структурный элемент РНК. Растительные токсины (рицин, а также родственные ему абрин, модекцин и целый ряд других) являются N-гликозидазами и катализируют депуринизацию аденилового нуклеотидного остатка на вершине «тетрапелти» GAGA, завершающей ризиновую шпильку

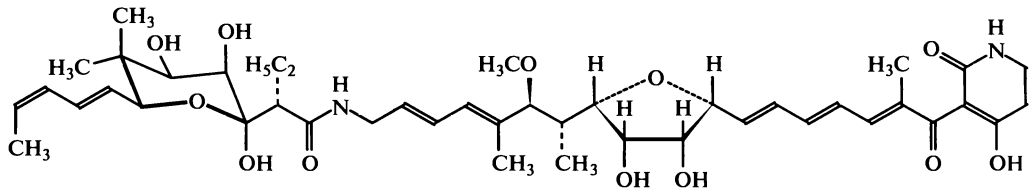


Рис. 9.14. Кирромицин

(A4324 в 28S рибосомной рРНК млекопитающих, который структурно эквивалентен A2660 в 23S рРНК *E. coli*). Депуринизация приводит к дестабилизации полинуклеотидной цепи в данном месте и последующему ее энзиматическому или спонтанному разрыву по механизму β -элиминации. Сарцин представляет собой грибную эндонуклеазу, которая гидролитически расщепляет полинуклеотидную цепь в той же тетрапетле после смежного гуанилового остатка (между остатками, эквивалентными G2661 и A2662 в РНК *E. coli*, см. подразд. 12.5.3 и 12.5.4, а также рис. 8.10). В результате этих разрывов нарушается связывание с рибосомой тройственного комплекса Аа-тРНК•еEF1А•GTP. Точно так же нарушается и связывание EF2•GTP, что приводит к ингибированию стадии транслокации.

Фусидовая кислота (см. подразд. 11.6 и рис. 11.4) в основном рассматривается как ингибитор транслокации, так как действует на EF-G, но по сути она ингибирует следующую за транслокацией стадией связывания аминоксил-тРНК. Антибиотик не влияет на рибосому, но связывается с EF-G, в результате чего EF-G приобретает повышенное сродство к участку связывания фактора на 50S рибосомной субъединице и остается в комплексе с ним после транслокации и гидролиза ГТФ. Таким путем комплекс EF-G•GDP с фусидовой кислотой ингибирует взаимодействие EF-Tu и аминокислотного конца тРНК с 50S субъединицей рибосомы.

В завершение необходимо рассмотреть кирромицин как антибиотик, прямо воздействующий на фактор EF-Tu. Кирромицин (рис. 9.14) не ингибирует связывания аминоксил-тРНК, но блокирует следующую стадию цикла. Он действует на EF-Tu так же, как фусидовая кислота действует на EF-G: в присутствии кирромицина EF-Tu приобретает высокое сродство к рибосоме и аминоксил-тРНК, в результате чего белковый фактор после гидролиза ГТФ не освобождается и блокирует аминокислотный конец, не позволяя ему участвовать в транспептидации. Нужно подчеркнуть, что взаимодействие кирромицина с EF-Tu индуцирует ГТФазную активность белка и в отсутствие рибосомы. Эти наблюдения были основанием для заключения, что гидролитический ГТФазный центр находится на самом EF-Tu, а не на рибосоме, и рибосома на определенной стадии лишь активирует латентную ГТФазную активность белка EF-Tu.

9.4. Ложное кодирование

Ложное кодирование, возникающее в результате некорректного связывания аминоксил-тРНК с рибосомой в присутствии стрептомицина и других аминоглицозидных антибиотиков, не является качественно новым явлением в функционировании аппарата трансляции. При трансляции всегда имеет место определенный, относительно низкий уровень ошибочного связывания аминоксил-тРНК с рибосомой, и аминоглицозидные антибиотики лишь увеличивают его. При этом

кодон, расположенный в А-участке рибосомы, может неправильно связаться лишь с ограниченным набором других («не своих») тРНК: взаимодействие происходит только с тРНК родственной кодирующей специфичности. Аминогликозидные антибиотики, как правило, стимулируют связывание того же набора «не своих» аминоацил-тРНК.

9.4.1. Ложное считывание поли(U)

В простейшей бесклеточной системе синтеза полифенилаланина на рибосомах *E. coli*, кодируемого поли(U), можно обнаружить заметное ложное включение лейцина и изолейцина, а также, в существенно меньших количествах, серина, тирозина и валина (Ниренберг и Маттей, 1961). Включение этих пяти аминокислот, в особенности лейцина и изолейцина, значительно стимулируется стрептомицином. На рис. 9.15 показано правильное кодон-антикодонное спаривание матричной поли(U) с тРНК^{Phe} (вверху слева) и известные типы некорректного спаривания с кодоном UUU антикодонов тРНК^{Ile}, тРНК^{Leu}, тРНК^{Ser}, тРНК^{Tyr} и тРНК^{Val} *E. coli*. Для того чтобы обеспечить ощутимое связывание «не своей» тРНК в А-участке рибосомы, должны быть спарены две из трех нуклеотидных позиций в кодон-антикодонном дуплексе (включая неканоническое спаривание в позиции нестрогого соответствия, т.е. первом положении антикодона — третьем положении кодона).

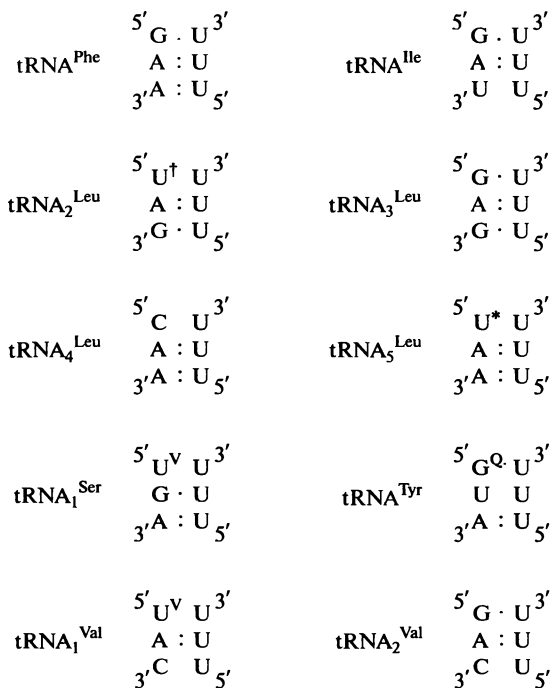


Рис. 9.15. Кодон-антикодонное спаривание поли(U) со «своими» и «не своими» тРНК:

U^V — 5-карбоксиметоксиуридин (с⁵U, или V, см. рис. 3.3);

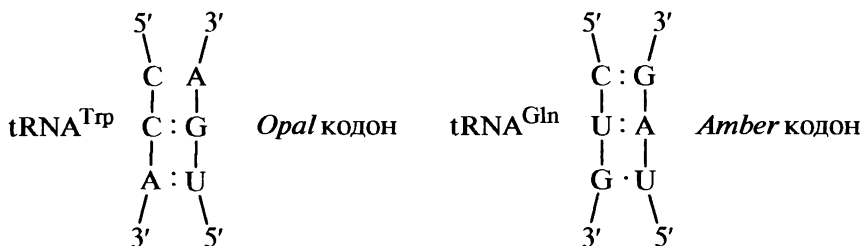
G^Q — кьюозин (Q, см. рис. 3.3);

U* — 5-карбоксиметиламинометил-2'-O-метилуридин (cmnm⁵Um);

U[†] — вероятно, модифицированный уридин

9.4.2. Прочитывание («текучесть») стоп-кодонов

Примером ложного кодирования *in vivo* является также сквозное прочитывание стоп-кодона мРНК вследствие ложного связывания с ним аминоксил-тРНК в А-участке рибосомы. В результате такого связывания транслирующая рибосома не останавливается, а продолжает читать мРНК за пределами стоп-кодона, удлиняя синтезируемую полипептидную цепь. В добавление к хорошо известным случаям, когда такой «проскок» стоп-кодона возникает вследствие существования специальных супрессорных видов тРНК, обладающих антикодоном, комплементарным стоп-кодону, наблюдаются также случаи ошибочного связывания нормальной аминоксил-тРНК дикого типа со стоп-кодонами в рибосоме. В частности, нормальная триптофанил-тРНК дикого типа с ее антикодоном ССА время от времени может взаимодействовать со стоп-кодоном UGA и включать триптофан в растущий полипептид, подавляя таким образом этот стоп-сигнал и продолжая трансляцию матрицы далее или приводя к супрессии мутации *opal* (CGA → UGA) внутри кодирующей последовательности (см. схему кодон-антикодонного спаривания ниже). Также глутаминил-тРНК дикого типа, с антикодоном CUG или s²UUG, иногда может связываться со стоп-кодоном UAG, что приводит к сквозному прочитыванию нормальной мРНК за пределы ее кодирующей последовательности или к супрессии *amber*-мутации (CAG → UAG) внутри кодирующей последовательности (см. схему спаривания ниже).



9.4.3. Основные типы некорректного спаривания

Анализ ложного кодирования в случае поли(U) и других матричных полинуклеотидов *in vitro* и *in vivo*, включая ложное кодирование, индуцированное различными аминокликозидными антибиотиками, показал, что ошибки обусловлены в основном неканоническими спариваниями G:U, U:G, а также U:U в любой позиции кодон-антикодонного дуплекса. Некорректное спаривание или противостояние типа U:C или C:U встречается менее часто. Некоторые редкие ошибки обусловлены противостоянием С антикодона и А кодона. В исключительных случаях ошибки связаны с образованием пар А:G или G:A, а также противостояниями С:С, А:А или G:G.

По-видимому, в позиции, для которой характерно нестрогое соответствие (первое положение антикодона — третье положение кодона), при некорректном спаривании возможны все типы противостояний, включая I:G, G:A, G:G, U:U, U:C, C:A, C:U и C:С. Это, вероятно, объясняет, почему часто в бесклеточной системе каждая изоакцепторная тРНК может узнавать все четыре кодона данной кодоновой семьи, т.е. все кодоны, имеющие одинаковые нуклеотиды в первых двух позициях.

В дополнение к аминокликозидным антибиотикам, некоторые менее специфические факторы, включая ионные условия среды, могут увеличивать количество ошибок при кодонзависимом поступлении аминоацил-тРНК в транслирующие рибосомы. В общем можно утверждать, что все факторы, усиливающие сродство тРНК к рибосоме, приводят к увеличению уровня ложного кодирования. Повышение концентрации Mg^{2+} в среде и добавление диаминов (например, путресцина) или полиаминов (спермидин, спермин) увеличивает уровень ошибок во время бесклеточной трансляции. Этанол и другие гидрофобные агенты, добавленные даже в низких концентрациях, также повышают уровень ложного кодирования. Наоборот, мочевины, ослабляющая межмолекулярные взаимодействия, приводит к уменьшению уровня ложного кодирования в бесклеточных системах. Из обычных факторов окружающей среды понижение температуры, pH и ионной силы способствуют ложному кодированию.

Структурные особенности самой тРНК также играют роль в точности кодонзависимого связывания аминоацил-тРНК в А-участке. В частности, была показана важность структуры D-шпильки для точности процесса. Например, мутационное изменение $G \rightarrow A$ в D-шпильке тРНК^{Trp} стимулирует спаривание этой тРНК (которая имеет антикодон CCA) с «не своими» кодонами UGA и UGU; имеются данные, что это изменение в D-шпильке увеличивает сродство тРНК к А-участку.

Далее, в точности выбора аминоацил-тРНК важную роль играет структура рибосомы. Горини (1971, 1974) первым продемонстрировал, что определенные мутации, приводящие к изменениям в компонентах рибосомы, могут либо уменьшать, либо увеличивать уровень ложного кодирования. Было обнаружено, что мутации в белке S12, вызывающие появление устойчивости к стрептомицину (*strA*-мутации), придают бактериальной рибосоме большую точность в кодонзависимом выборе аминоацил-тРНК (см. подразд. 9.3.2). Напротив, так называемые *ram*-мутации, которые возникают в результате некоторых аминокислотных замен или делеций в белке S4, делают рибосому менее селективной и увеличивают уровень ложного кодирования. Специфические мутационные изменения в белке S5 также уменьшают селективность рибосомы. Было показано, что мутации в эукариотических (дрожжевых) аналогах этих белков оказывают те же эффекты на точность эукариотической рибосомы. Упомянутые мутационные изменения белков S4 и S5 имеют место в районах контакта этих белков друг с другом и, таким образом, нарушают их связь в рибосоме. Рентгеноструктурный анализ функциональных комплексов рибосомных частиц (30S субъединиц) показал, что переход их из открытой (разомкнутой) в закрытую (сомкнутую) конформацию, индуцируемый связыванием аминоацил-тРНК с А-участком малой субъединицы (см. подразд. 9.1.6), сопровождается разрывом полярных взаимодействий между белками S4 и S5 (Рамакришнан и др., 2002). Таким образом, указанные мутации белков S4 и S5, избавляя рибосому от энергетических затрат на разрыв межбелкового контакта, должны способствовать сдвигу равновесия в сторону закрытой (сомкнутой) конформации А-участка, который и приводит к повышению уровня ложного кодирования.

Представляется весьма вероятным, что подобный же сдвиг равновесия в сторону более закрытой (сомкнутой) конформации А-участка является причиной увеличения сродства аминоацил-тРНК к А-участку и, следовательно, повышения

уровня ложного кодирования под действием таких неспецифических РНК-компактизирующих агентов и условий среды, как повышенные концентрации Mg^{2+} и полиаминов, этанол, пониженные температуры и т. п.

Итак, факторы окружающей среды, перечисленные выше, а также структурные факторы, присущие компонентам системы, влияют на степень селективности мРНК-программированной рибосомы по отношению к тРНК. В то же время уровень ложного кодирования в системе зависит не только от селективности, определяемой свойствами компонентов в данных условиях, но и от соотношения компонентов. Когда отношение концентрации «не своей» тРНК к концентрации «своей» тРНК в бесклеточной системе или в клетке увеличивается, вероятность ложного связывания повышается. По этой причине, например, когда в бесклеточной системе транслируется поли(U) и количество «своей» фенилаланил-тРНК в результате синтеза исчерпывается, включение в полипептид лейцина, изолейцина и других «неправильных» аминокислот имеет тенденцию к увеличению. В экстремальном случае система с поли(U)-программированными рибосомами может быть снабжена только лейцил-тРНК, и тогда на матрице поли(U) будет синтезироваться чистый полилейцин (хотя, конечно, синтез будет идти со значительно меньшей скоростью, чем шел бы синтез полифенилаланина). В природных системах (в клетках) количество аминокислот, неправильно включенных в синтезируемый полипептид, тоже может существенно зависеть от концентраций различных видов аминоацил-тРНК. Так, голодание по некоторым аминокислотам в клетке приводит к замене этих аминокислот в синтезируемых полипептидных цепях на аминокислоты с близкой кодирующей специфичностью (Паркер и др., 1978; Галлант и Фолли, 1979). В случаях суперпродукции чужеродных белков в бактериальных клетках также может наблюдаться значительная ложная трансляция, обусловленная нарушениями нормального баланса между различными аминокислотами во внутриклеточной среде (Богосян, Кейн и др., 1990).

9.4.5. Уровень ложного кодирования *in vivo* в нормальных условиях

Поскольку уровень ложного кодирования в значительной степени зависит от целого ряда факторов окружающей среды и структурных факторов, понятно, что как в бесклеточных системах, так и *in vivo* он может сильно варьировать. Поэтому важно оценить естественный уровень ложного кодирования в нормальных живых клетках, которые не находятся в экстремальных условиях и не несут мутаций, влияющих на белоксинтезирующий аппарат.

Уже в 1970-х гг. было сделано несколько успешных попыток определения уровня ложного кодирования *in vivo*. При оценке уровня ложного включения валина вместо треонина (Val/Thr) в α -цепи глобина кролика были получены значения $2 \cdot 10^{-4}$ — $6 \cdot 10^{-4}$ (Лофтфилд и Вандерйагт, 1972; Лофтфилд и др., 1979). Частота включения цистеина вместо аргинина в заверченный (свернутый и собранный) флагеллин *E. coli*, который не содержит кодируемого цистеина, была того же порядка — 10^{-4} на один аргининовый кодон (Эдельман и Галлант, 1977). Позднее более прямые оценки уровня ложного кодирования *in vivo* принципиально подтвердили значения от 10^{-4} до 10^{-3} для средней частоты ошибок трансляции на кодон (см. обзор: Kurland, C.G., et al., 1990).

Однако оказалось, что некоторые кодоны могут быть ложно прочитаны с большей частотой, чем средняя частота трансляционных ошибок. В частности, ложное

кодирования в пределах одной кодоновой группы (т.е. среди кодонов, различающихся только третьим нуклеотидом) более вероятно, чем другие замены. Из кодового словаря (см. рис. 2.2) следует, что наиболее вероятными аминокислотными заменами в результате ложного кодирования должны быть следующие: Phe \leftrightarrow Leu, Cys \leftrightarrow Trp, His \leftrightarrow Gln, Ile \leftrightarrow Met, Asn \leftrightarrow Lys, Ser \leftrightarrow Arg и Asp \leftrightarrow Glu. Можно ожидать, что замена в направлении слева направо (ложное спаривание с U, в меньшей степени — с C в третьем положении кодона) более вероятна, чем замена справа налево (ложное спаривание с A или G в третьем положении кодона). Действительно, включение лизина вместо аспарагина происходит значительно чаще, чем замена лизина аспарагином. Подобным образом гистидин часто заменяется глутамином, в то время как глутамин заменяется редко. Например, в экспериментах по трансляции *in vivo* мРНК белка оболочки бактериофага MS2 частота ложного прочтения кодона аспарагина AAU, приводящая к включению положительно заряженного лизина вместо незаряженного аспарагина, была около $5 \cdot 10^{-3}$ (хотя частота ложного прочтения другого аспарагинового кодона — AAC — была на порядок меньше, около $2 \cdot 10^{-4}$) (Паркер и др., 1983). Сообщалось, что в исключительных случаях уровень некоторых замен аминокислот в результате ошибок достигает 10^{-2} на кодон.

Уровень ложного кодирования в бесклеточных системах обычно значительно выше, чем *in vivo*: частота замен может нередко достигать 10^{-2} , а внутри одной кодоновой группы (например, в случае замен Phe \rightarrow Leu) — даже 10^{-1} на кодон. В контролируемых ионных условиях, однако, — при пониженных концентрациях Mg^{2+} и оптимальных соотношениях других компонентов — уровень ложного кодирования может приближаться к значениям от 10^{-4} до 10^{-3} ошибок на кодон.

Нужно отметить, что в определенных условиях уровень ложного кодирования *in vivo*, как в бактериальных клетках, так и в клетках животных, может быть значительно увеличен по сравнению с нормой. Это происходит не только при нехватке определенных аминокислот (аминокислотном голодании), как уже указывалось ранее, но и в присутствии этанола и некоторых других агентов в культуральной среде и при некоторых других воздействиях. Как уже упоминалось, ложное кодирование в клетке увеличивается в ответ на аминогликозидные антибиотики.

Определенный уровень ложного кодирования может иметь большое биологическое значение и поэтому поддерживается в эволюции. Получены бактериальные мутанты с низким уровнем ложного кодирования (например, стрептомицинрезистентные мутанты), но у природных (диких) штаммов, изолированных из окружающей среды и более адаптированных для выживания, этот уровень всегда выше. Нет сомнений, что в определенных условиях ложное кодирование вносит свой вклад в выживание — например, в случае летальных мутаций, которые организм способен пережить за счет ложного кодирования. Так, ложное связывание аминоацил-тРНК с терминирующим кодоном, возникшим вследствие мутации смыслового кодона, может обеспечить завершение синтеза полноразмерной полипептидной цепи и, с какой-то вероятностью, образование функциональной белковой молекулы. Результатом этой «лжи во спасение» является шанс на выживание летального мутанта, несущего «бессмысленную» мутацию в жизненно важном белке. Подобным же образом некоторые мутанты с летальными точечными заменами аминокислот в жизненно важных белках могут выживать благодаря ложному кодированию. Кроме того, в ряде случаев клетка постоянно использует ложное связывание аминоацил-тРНК с нормальным терминирующим кодоном в конце

кодирующей последовательности мРНК; это время от времени происходящее событие приводит к сквозному прочитыванию мРНК за пределы обычной кодирующей области (см. подразд. 13.1) и тем самым к синтезу небольших количеств более длинных полипептидов, формирующих функционально отличный белок, необходимый для клетки. Возможно также, что клетка использует ложное кодирование в кодирующей области мРНК для того, чтобы в дополнение к основной (кодируемой) версии данного белка синтезировать некоторые необходимые варианты данного белка в малых количествах. В любом случае слишком высокая точность кодирования во время трансляции, вероятно, ограничивает функциональную гибкость клетки, необходимую для выживания в непредсказуемых условиях.

Другой аспект роли ложного кодирования касается скорости синтеза белка. Дело в том, что точность требует времени и энергии. Следовательно, приобретение избыточно высокой точности будет замедлять трансляцию и истощать энергетические ресурсы клетки (Курланд и др., 1990). По этой причине все живые организмы в их эволюции вынуждены поддерживать баланс между разумным уровнем точности трансляционного аппарата и достаточной скоростью синтеза белка для обеспечения адекватной активности, роста и размножения.

9.4.6. Кинетические механизмы ложного кодирования и его коррекции

В любом случае ложное кодирование зависит от сродства антикодона к кодону. Сродство является наиболее сильным, когда антикодон комплементарен кодону, и поэтому с кодоном связывается преимущественно «своя» тРНК. При частичной комплементарности сродство значительно меньше, но еще существует и, таким образом, некоторые «не свои» виды тРНК также могут на короткое время связываться с кодоном. Эксперименты с комплексами между различными полинуклеотидами продемонстрировали, что различия в константах сродства в случаях комплементарного и частично комплементарного спаривания в основном определяются различиями во временах жизни этих комплексов, т.е., в скоростях диссоциации, в то время как скорости формирования комплексов существенно не различаются, если различаются вообще. Все это заставляет предполагать, что вероятность формирования неправильного (частично комплементарного) кодон-антикодонного комплекса может быть так же высока, как и вероятность формирования правильного (полностью комплементарного) комплекса, но неправильный комплекс распадается быстрее, т.е. имеет более короткое время жизни.

Из вышеизложенного прямо следует, что, если в цикле элонгации за обратимым кодонзависимым связыванием аминоксил-тРНК следует необратимая стадия, то скорость необратимого процесса будет влиять на уровень ложного кодирования: чем выше скорость следующей необратимой стадии, тем больше уровень ложного кодирования (Нинио, 1974). Роль такой необратимой стадии может играть транспептидация с последующей транслокацией. Действительно, поскольку образование комплексов кодона со «своей» и с «не своей» тРНК происходит с приблизительно одинаковыми скоростями, выбор молекул тРНК — дискриминация между «своей» и «не своей» — основан только на том факте, что неправильный комплекс распадается быстрее. Однако, если скорость следующей стадии цикла очень велика и сравнима со скоростью распада неправильного комплекса, то высокая вероятность вовлечения в цикл «не своей» тРНК. Ясно, что чем выше ско-

ность следующей стадии, тем больше вероятность захвата «не своей» тРНК. Напротив, если следующая необратимая стадия происходит с меньшей скоростью, условия приближаются к равновесным, и выбор между «своими» и «не своими» видами тРНК сильнее зависит от различий в константе их сродства к кодону. Для уменьшения уровня ложного кодирования рибосома, по-видимому, обладает специальным механизмом *кинетической задержки* на стадии обратимого кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК. Определенную роль в этом механизме может играть фактор EF-Tu (EF1A): этот белок, связанный с ГТФ, блокирует

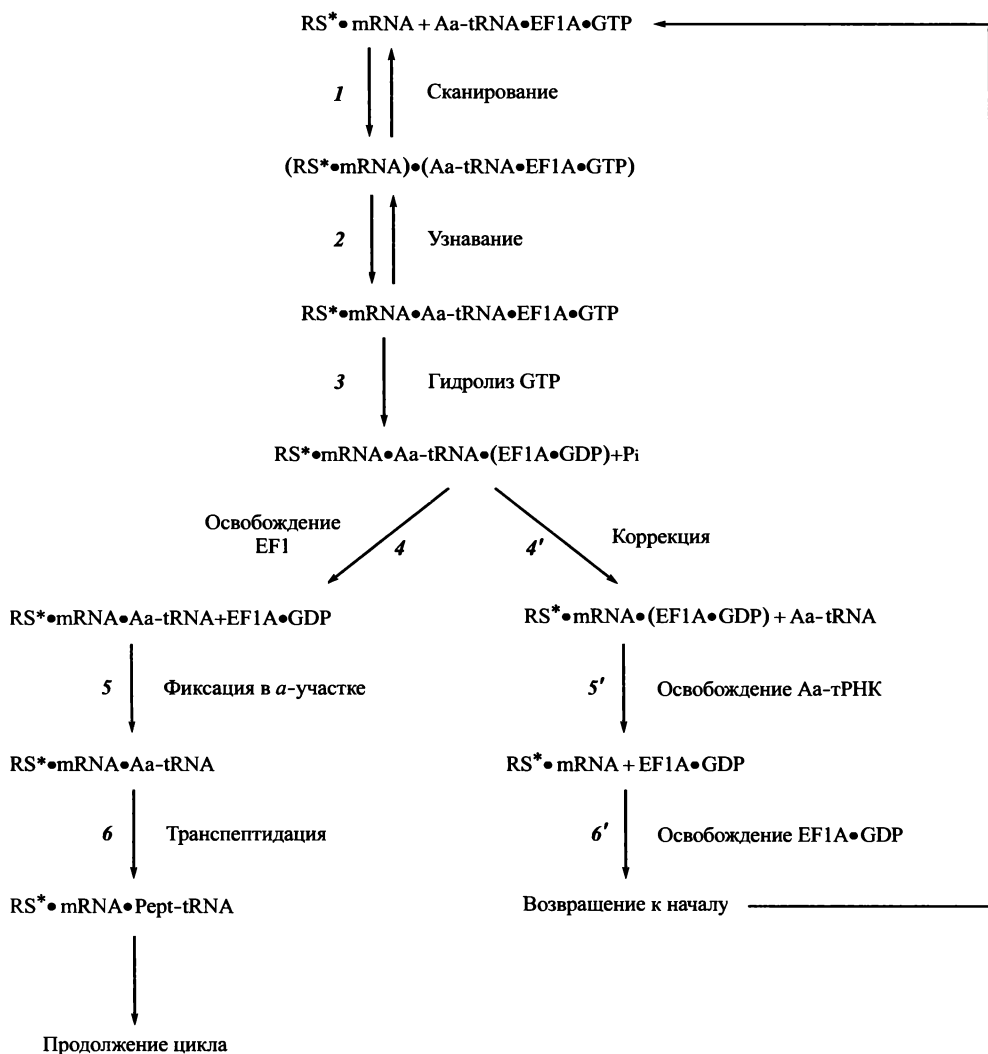


Рис. 9.16. Схема пути вхождения аминоксил-тРНК в транслирующую рибосому и коррекции «неправильного» связывания:

RS* — транслирующая рибосома, содержащая пептидил-тРНК в Р-участке. В скобках — части комплекса, предположительно лабильно связанные с остальной частью транслирующего комплекса.

Пояснение см. в тексте

последующие стадии цикла до тех пор, пока ГТФ не гидролизуется, а следовательно, тройственный комплекс остается обратимо ассоциированным с рибосомой, так что имеется вероятность преимущественной диссоциации неправильно-го кодон-антикодонового комплекса.

С другой стороны, дискриминация между «своей» и «не своей» аминоацил-тРНК на рибосоме может быть еще больше усилена, чем это следует из простого различия в константах сродства. Если процесс связывания аминоацил-тРНК складывается из двух обратимых стадий, которые разделены практически необратимой стадией, то аминоацил-тРНК имеет два независимых шанса для диссоциации. В этом случае общая вероятность диссоциации равна произведению вероятностей диссоциации на каждой из стадий, т.е. дискриминация между «своей» и «не своей» тРНК значительно усилена по сравнению с тем уровнем, который обеспечивается различиями в константах сродства (Хопфилд, 1974). Так, функционирует механизм *кинетической коррекции*, или «редактирования». В нем снова играет роль фактор EF-Tu. Первая стадия — обратимое связывание тройственного комплекса Aa-tRNA•EF-Tu•GTP до гидролиза ГТФ, при котором существует повышенная вероятность диссоциации комплекса с «не своей» тРНК из рибосомы. Последующий гидролиз ГТФ является практически необратимой разделяющей стадией. После гидролиза ГТФ аминоацил-тРНК имеет еще одну независимую возможность диссоциировать из комплекса с кодоном на стадии диссоциации EF-Tu•GDP из рибосомы.

Вышеизложенная ситуация схематически представлена на рис. 9.16. В случае «своей» аминоацил-тРНК скорость побочной реакции 4' (правая стрелка, распад кодон-антикодонового комплекса до освобождения EF-Tu•GDP) будет низкой по сравнению со скоростью основной реакции 4 (левая стрелка, освобождение EF-Tu•GDP), т.е. $k_4 \gg k_4'$. В случае менее стабильного комплекса с «не своей» тРНК побочная реакция 4' происходит значительно быстрее и конкурирует с основной реакцией 4, т.е. $k_4' > k_4$. Таким образом, дискриминация между «своей» и «не своей» тРНК осуществляется дважды: на основе различий в скоростях, с которыми распадается кодон-антикодоновый комплекс в реакции 2 (различия в k_2) и на основе различий в скоростях, с которыми распадается кодон-антикодоновый комплекс в реакции 4' (различия в k_4'). Гидролиз ГТФ, являющийся практически необратимым процессом, служит для разделения этих двух стадий, и в этом смысле освобожденная свободная энергия, диссипирующая в тепло, увеличивает точность трансляции.

9.5. Общая схема последовательности событий при связывании аминоацил-тРНК с рибосомой

9.5.1. Сканирование (перебор) тРНК (стадия 1)

В процессе элонгации в растве, окружающем рибосому, присутствуют различные виды аминоацил-тРНК. Из этой смеси рибосома должна отобрать аминоацил-тРНК, соответствующую кодону матрицы, расположенному в A-участке. Для этого должно быть выполнено быстрое сканирование различных аминоацил-тРНК (в форме их тройственных комплексов Aa-tRNA•EF-Tu•GTP), и только комплекс, узнаваемый рибосомой как «свой», «родственный» кодону, должен

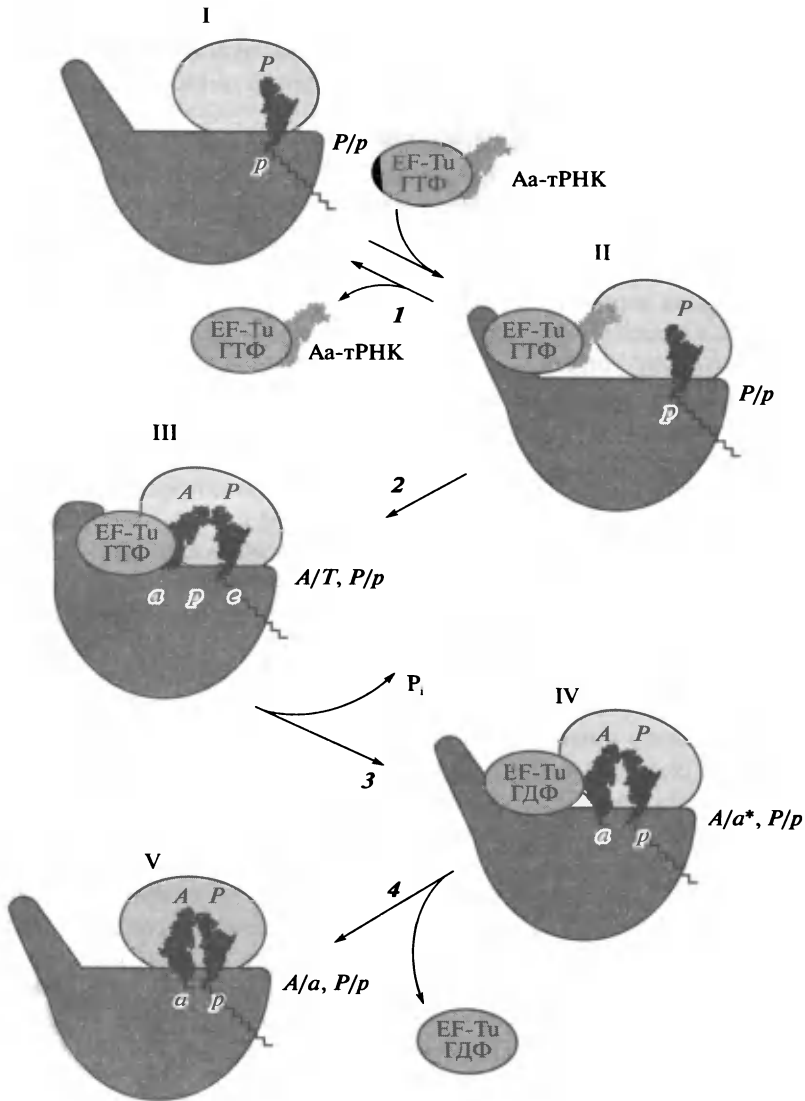


Рис. 9.17. Схема последовательности событий в процессе кодонзависимого связывания аминоксил-тРНК с транслирующей рибосомой.

1: сканирование (перебор) аминоксил-тРНК. **2:** узнавание антикодона. **3:** гидролиз ГТФ. **4:** освобождение EF-Tu.

I—V — состояния рибосомного комплекса.

Пояснения см. в тексте

остаться связанным с рибосомой. Такое сканирование предполагает множественные столкновения между фиксированным на рибосоме кодоном и антикодонами различных тРНК. Можно задать вопрос: происходит ли этот перебор за счет неупорядоченных диффузионных столкновений между неориентированными тРНК и рибосомой или путем быстрого формирования и распада короткоживущих промежуточных комплексов между тРНК и рибосомой, при котором антикодон и кодон сталкиваются уже в надлежащей ориентации?

Изучение быстрой кинетики процесса связывания тРНК с рибосомой свидетельствует в пользу второй альтернативы (Винтермейер и др., 1993). Действительно показано, что кинетика связывания тРНК с рибосомой является многофазной. Первая быстрая фаза может быть интерпретирована как формирование короткоживущего промежуточного комплекса, которое не зависит от матричного кодона, и его быстрый распад (рис. 9.17, 1). Промежуточный короткоживущий рибосомный комплекс образуется вследствие столкновения между тройственным (Aa-tRNA•EF-Tu•GTP) комплексом и рибосомой, и комплементарное взаимодействие кодона с антикодоном не обязательно для его формирования. Можно предположить, что образование и распад таких короткоживущих комплексов используется для сканирования (перебора) антикодонов. Только в случае соответствия антикодона и кодона происходит узнавание, которое вызывает перестройку комплекса, приводящую к связыванию. Вероятно, присутствие молекулы EF-Tu в тройственном комплексе помогает сформировать промежуточный короткоживущий рибосомный комплекс: он может лабильно взаимодействовать с участком связывания фактора (область L7/L12-стержня) на 50S субъединице рибосомы, правильно ориентируя таким образом тРНК на 30S субъединице для направленного столкновения кодона и антикодона. Эта короткоживущая стадия связывания тРНК, предшествующая кодон-антикодонному узнаванию, может быть определена как состояние сканирования, или *T*-состояние рибосомного комплекса (состояние II).

9.5.2. Узнавание антикодона (стадия 2)

Изучение многофазной кинетики связывания тРНК показало, что только когда «свой» кодон находится в *A*-участке, за быстрой фазой следует медленная, во время которой короткоживущий комплекс перестраивается в более стабильный комплекс. В результате этой перестройки антикодон тРНК становится специфически связанным с кодоном *A*-участка рибосомы. Эксперименты с негидролизруемыми или медленно гидролизруемыми аналогами ГТФ (см. рис. 8.8) показали, что на данной стадии тройственный комплекс Aa-tRNA•EF-Tu•GTP обратимо ассоциирован с рибосомой и если гидролиз ГТФ происходит не очень быстро, может быть достигнуто равновесие. Таким образом, эта стадия обеспечивает первый этап выбора аминокислот-тРНК в соответствии с ее кодирующей специфичностью (см. рис. 9.17, 2). Очевидно, именно на этой стадии происходит смыкание структурных блоков, формирующих *A*-участок на 30S субъединице, вокруг антикодонной ветви молекулы аминокислот-тРНК (переход *A*-участка из открытого в закрытое состояние; см. подразд. 9.1.6 и рис. 9.3). Таким образом, в результате кодон-антикодонного узнавания рибосомный комплекс приходит к состоянию, которое можно обозначить как *A/T*, *P/p* (см. рис. 9.17, состояние III). В данном состоянии аминокислот-тРНК связана с 70S рибосомой, по крайней мере, в двух точках: антикодоном через кодон мРНК с 30S субъединицей рибосомы и акцепторным черешком через EF-Tu с 50S субъединицей рибосомы.

9.5.3. Гидролиз ГТФ (стадия 3)

В состоянии *A/T*, *P/p* рибосомного комплекса, описанном выше, индуцируется гидролиз ГТФ, связанного с EF-Tu (см. рис. 9.17, 3). Гидролиз индуцирует-

из взаимодействием EF-Tu с факторсвязывающим участком 50S субъединицы. Гидролиз ГТФ как практически необратимая стадия делит процесс связывания аминоацил-тРНК на две фазы, которые не связаны равновесием (см. подразд. 9.4.6). Чем короче временной интервал между узнаванием тРНК и гидролизом ГТФ, тем меньше избирательность стадии узнавания. Наоборот, если гидролиз искусственно замедлен, например, за счет использования медленно гидролизуемого аналога ГТФ, такого как гуанозин-5'-(γ -тио)трифосфат (см. рис. 8.8), уровень ошибочного связывания аминоацил-тРНК уменьшается.

Когда ГТФ, связанный с EF-Tu, гидролизуется, не обнаруживается никакого промежуточного фосфорилированного продукта, а фосфат переносится непосредственно на молекулу воды. Другими словами, нет никакого биохимического сопряжения гидролиза ГТФ с процессом потребления энергии; вся свободная энергия гидролиза ГТФ диссипирует в тепло. При этом гидролиз ГТФ означает разрушение лиганда, благодаря которому EF-Tu приобрел сродство к аминоацил-тРНК и рибосоме. Соответственно гидролиз ГТФ приводит к падению сродства EF-Tu к аминоацил-тРНК и рибосоме, что является следствием конформационной перестройки EF-Tu. Это и есть энергетический вклад ГТФ.

Акцепторная ветвь аминоацил-тРНК, освобожденная из комплекса с EF-Tu, теперь получает возможность непосредственно взаимодействовать с большой рибосомной субъединицей. Однако, до тех пор, пока из рибосомы не ушел EF-Tu с ГДФ, это взаимодействие не приводит к закреплению аминоацилированного конца аминоацил-тРНК в a -участке пептидилтрансферазного центра (ПТЦ). По-видимому, это промежуточное состояние связывания аминоацильного конца (обозначенное как A/a^* на рис. 9.17, состояние IV) обусловлено конформационной некомпетентностью рибосомы окончательно фиксировать аминоацилированный конец в ПТЦ из-за присутствия EF-Tu.

9.5.4. Освобождение EF-Tu (стадия 4)

Итак, гидролиз ГТФ приводит к образованию промежуточного рибосомного комплекса, в котором EF-Tu более не имеет сродства к аминоацил-тРНК (см. рис. 9.17, состояние IV). В результате этого аминоацил-тРНК перестает быть прикрепленной к рибосоме через EF-Tu и, очевидно, пока непрочно закреплена на большой рибосомной субъединице, так что снова имеет возможность диссоциировать из рибосомного комплекса. Если скорость диссоциации высока, как в случае ошибочно связанной «не своей» тРНК, то она может уйти до того, как EF-Tu•GDP покинет рибосому (см. рис. 9.16, реакция 4'). Однако если скорость диссоциации невысока, как в случае правильного кодон-антикодонного взаимодействия, то слабо связанный EF-Tu•GDP уйдет из рибосомы раньше (см. рис. 9.16, реакция 4), и аминоацильный конец аминоацил-тРНК будет прочно захвачен 50S рибосомной субъединицей. Таким образом, после того как ГТФ гидролизуется, рибосоме представляется новая возможность скорректировать результат выбора аминоацил-тРНК, сделанного до гидролиза ГТФ.

После освобождения EF-Tu•GDP (см. рис. 9.17, 4) акцепторный конец аминоацил-тРНК взаимодействует с a -участком пептидилтрансферазного центра 50S субъединицы и полностью замыкается в A -участке (см. рис. 9.17, состояние V). Замыкание сопровождается, по-видимому, определенными конформационными изменениями в рибосоме: образованием дополнительных, неспецифических к

виду тРНК, контактов молекулы тРНК — прежде всего, центрального ядра («угла») молекулы — со структурами А-участка 50S субъединицы, а также межсубъединичными подвижками. Это — конечная фаза связывания аминоксил-тРНК с А-участком, когда достигается так называемое состояние А/а, Р/р рибосомного комплекса. Теперь аминоксил-тРНК готова взаимодействовать с пептидил-тРНК, связанной в Р-участке, в реакции транспептидации (см. гл. 10).

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 9

- Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**: 1143 — 1154.
- Carter, A. P., Clemons, W. M. J., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**: 340 — 348.
- Chapeville, F., Lipmann, E., von Ehrenstein, G., Weisblum, B., Ray, W. J., and Benzer, S. (1962). On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**: 1086 — 1092.
- Coons, S. F., Smith, L. F., and Loftfield, R. B. (1979). The nature of amino acid errors in *in vivo* biosynthesis of rabbit hemoglobin. *Fed. Proc.* **38**: 328.
- Crick, F. H. C. (1966). Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* **19**: 548 — 555.
- Davies, J. E., Gilbert, W., and Gorini, L. (1964). Streptomycin, suppression, and code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**: 883 — 890.
- Davies, J. E., Gorini, L., and Davis, B. D. (1965). Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Mol. Pharmacol.* **1**: 93 — 106.
- Edelman, P., and Gallant, J. (1977). Mistranslation in *E. coli*. *Cell* **10**: 131 — 137.
- Ehrenstein, von, G., Weisblum, B., and Benzer, S. (1963) The function of sRNA as amino acid adaptor in the synthesis of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 669 — 675.
- Fourmy, D., Recht, M. A., Blanchard, S., and Puglisi, J. D. (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274**: 1367 — 1371.
- Goodman, H. M., Abelson, J., Landy, A., Brenner, S., and Smith, J. D. (1968). Amber suppression: A nucleotide change in the anticodon of a tyrosine transfer RNA. *Nature* **217**: 1019 — 1024.
- Gorini, L. (1971). Ribosomal discrimination of tRNAs. *Nature New Biol.* **234**: 261 — 264.
- Hopfield, J. J. (1974). Kinetic proofreading: A new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 4135 — 4139.
- Loftfield, R. B., and Vanderjagt, D. (1972). The frequency of errors in protein biosynthesis, *Biochem. J.* **128**: 1353 — 1356.
- Ninio, J. (1974). A semi-quantitative treatment of missense and nonsense suppression in the *strA* and *ram* ribosomal mutants of *Escherichia coli*: Evaluation of some molecular parameters of translation *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **84**: 297 — 313.
- Nirenberg, M. W., and Matthaei, H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**: 1558 — 1602.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**: 897 — 902.
- Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., and Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**: 721 — 732.
- Parker, J., Johnston, T. C., Borgia, P. T., Holtz, G., Remaut, E., and Fiers, W. (1983). Codon usage and mistranslation. *In vivo* basal level misreading of the MS2 coat

protein message. *J. Biol. Chem.* **258**: 10007—10012.

Parker, J., Pollard, J. W., Friesen, J. D., and Stanners, C. P. (1978). Shuttering: High-level mistranslation in animal and bacterial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1091—1095.

Pirohit, P., & Stern, S. (1994). Interactions of a small RNA with antibiotics and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* **370**: 659—662.

Обзоры, сборники

Bogosian, G., Violand, B. N., Jung, P. E., and Kane, J. F. (1990). Effect of protein overexpression on mistranslation in *Escherichia coli*. In *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 546—558. ASM Press, Washington, D. C.

Cundliffe, E. (1980). Antibiotic and prokaryotic ribosomes: Action, interaction, and resistance. In *Ribosome: Structure, Function, and Genetics* (eds. Chambliss, G., Craven, G. R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., and Nomura, M.), pp. 555—581. University Park Press, Baltimore.

Cundliffe, E. (1990). Recognition sites for antibiotics within rRNA. In *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 479—490. ASM Press, Washington, D. C.

Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H., and Waring, M. J. (1981). *The Molecular Basis of Antibiotic Action*. Wiley & Sons, London.

Gallant, J., and Foley, D. (1979). On the causes and prevention of mistranslation. In *Ribosome: Structure, Function, and Genetics* (Chambliss G., Craven G. R., J. Davies, K. Davis, L. Kahan, and M. No-

mura, eds.), pp. 615—638. University Park Press, Baltimore.

Gorini, L. (1974). Streptomycin and misreading of the genetic code. In *Ribosomes* (eds. Nomura, M., Tissieres, A., and Lengyel, P.) pp. 791—803. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Kurland, C. G., and Ehrenberg, M. (1984). Optimization of translation accuracy. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **31**: 191—219.

Kurland, C. G., Joergensen, F., Richter, A., Ehrenberg, M., Bilgin, N., and Rojas, A.-M. (1990). Through the accuracy window. In: *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 513—516. ASM Press, Washington, D. C.

Noller, H. F., Moazed, D., Stern, S., Powers, T., Allen, P. N., Robertson, J. M., Weiser, B., and Triman, K. (1990). Structure of rRNA and its functional interactions in translation. In *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 73—92. ASM Press, Washington, D. C.

Pestka, S. (1977). Inhibitors of protein synthesis. In *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* (eds. Weissbach, H., and Pestka, S.), pp. 467—555. Academic Press, New York.

Rodnina, M. V., Fricke, R., and Wintermeyer, W. (1993). Kinetic fluorescence study on EF-Tu-dependent binding of Phe-tRNA^{Phe} to the ribosomal A site. In: *The Translational Apparatus* (eds. Nierhaus, K. H., Franceschi, F., Subramanian, A. R., Erdmann, V. A., and Wittmann-Liebold, B.), pp. 317—326. Plenum Press, New York.

Watanabe, K., and Osawa, S. (1995). tRNA sequences and variations in the genetic code. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (eds. Söll, D., and Raj-Bhandary, U. L.), pp. 225—250. ASM Press, Washington, D. C.

ЭЛОНГАЦИОННЫЙ ЦИКЛ, СТАДИЯ II: ТРАНСПЕПТИДАЦИЯ (ОБРАЗОВАНИЕ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ)

10.1. Химия реакции

После того как аминоацил-тРНК полностью связалась в *A*-участке рибосомы, удерживающей пептидил-тРНК в *P*-участке, 3'-концы двух остатков тРНК оказываются поблизости друг от друга в области пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) большой рибосомной субъединицы (см. рис. 8.3, внизу справа). Затем следует нуклеофильная атака аминогруппы молекулы аминоацил-тРНК на карбонильную группу сложноэфирной связи между остатками пептида и тРНК молекулы пептидил-тРНК (см. рис. 8.5). В результате реакции формируется амидная (пептидная) связь между пептидным остатком и молекулой аминоацил-тРНК. Пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК являются субстратами этой реакции. Пептидил-тРНК — донорный субстрат, а аминоацил-тРНК — акцепторный субстрат. Продукты реакции — деацилированная тРНК в *P*-участке и расположенная в *A*-участке пептидил-тРНК с пептидным остатком, удлинённым на один аминокислотный остаток, прикрепленный к тРНК (см. рис. 8.3, внизу слева, и рис. 8.5).

Реакция происходит только с NH_2 -группой в α -положении аминоацильного остатка, и этот остаток должен иметь *L*-конфигурацию. Чтобы служить акцепторным субстратом, реагирующий аминоацильный остаток в *a*-участке ПТЦ должен быть присоединен в 3'-положении (но не в 2'-положении) рибозы концевой аденозина тРНК. Последнее требует специального комментария. Дело в том, что в зависимости от специфичности различных аминоацил-тРНК-синтетаз аминоацильные остатки оказываются присоединены либо в 2'-, либо в 3'-положении остатка рибозы концевой аденозина тРНК (см. подразд. 3.4 и табл. 3.1). Однако в растворе аминоацильный остаток спонтанно мигрирует между 2'- и 3'-положениями. В ПТЦ рибосомы аминоацильный остаток фиксируется только в 3'-положении.

Свободный 2'-гидроксил рибозы акцепторного субстрата не существенен для транспептидации; если он замещен (например, метилирован) или отсутствует (в 2'-дезоксипроизводных), акцепторная активность субстрата сохраняется. Однако 2'-гидроксил необходим для активности донорного субстрата. В то же время ряд экспериментов демонстрирует относительно низкую специфичность рибосомного ПТЦ по отношению к типам связей, образуемых в нем. Действительно, если к тРНК или аналогу ее 3'-конца вместо α -аминокислоты ($\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{CO}-$) прикреплен остаток α -оксикислоты ($\text{HO}-\text{CHR}-\text{CO}-$), то оксипроизводное служит хорошим акцепторным субстратом и рибосома катализирует образование сложноэфирной связи вместо амидной (пептидной) (Рич и др., 1970). Подобным же образом, если акцепторным субстратом является тиоацильное производное, рибосомный ПТЦ катализирует образование тиоэфирной связи (Гуч и Хоутри, 1975). Донорный субстрат также может быть модифицирован, и рибосома способна катализировать атаку аминогруппы акцепторного субстрата на тиоэфирную группу донорного субстрата с образованием тиоамидной связи (Гот-

тих и др., 1976). Наконец, было показано, что фосфиноэфирный аналог донорного субстрата может реагировать с аминоксил-тРНК в рибосомном ПТЦ с образованием неприродной фосфиноамидной связи (Хомутов и др., 1981). Последний факт особенно интересен, поскольку геометрия атакуемой группы и переходного состояния реакции (треугольная бипирамида) существенно отличается от таковой в случае нормального донорного субстрата (см. подразд. 10.2); механизм нуклеофильного катализа, подобный обычно реализуемому в белках-ферментах, вряд ли совместим с прохождением столь разных реакций в одном и том же каталитическом центре. Поэтому многие полагают, что транспептидация в рибосоме катализируется в основном благодаря подходящей пространственной ориентации и стереохимической подгонке реагирующих групп аминоксил-тРНК и пептидил-тРНК, без значительного каталитического вклада окружающих полярных групп ПТЦ.

В то же время рибосомный ПТЦ в определенных условиях может использовать в качестве акцепторных субстратов воду и низкомолекулярные спирты, такие как метанол и этанол, осуществляя таким образом гидролиз или алкоголиз пептидил-тРНК. Эти наблюдения трудно объяснить в рамках исключительно ориентационного механизма каталитического действия ПТЦ. Наиболее разумной кажется компромиссная точка зрения, согласно которой ориентационный эффект действительно является основным механизмом катализа транспептидации в рибосоме, но и специфическое микроокружение также вносит свой вклад. Вблизи субстратов, нужным образом ориентированных в рибосоме (в районе ПТЦ), расположены группы, которые в принципе способны оттягивать протон от NH_2 -группы акцепторного субстрата, тем самым усиливая ее нуклеофильную

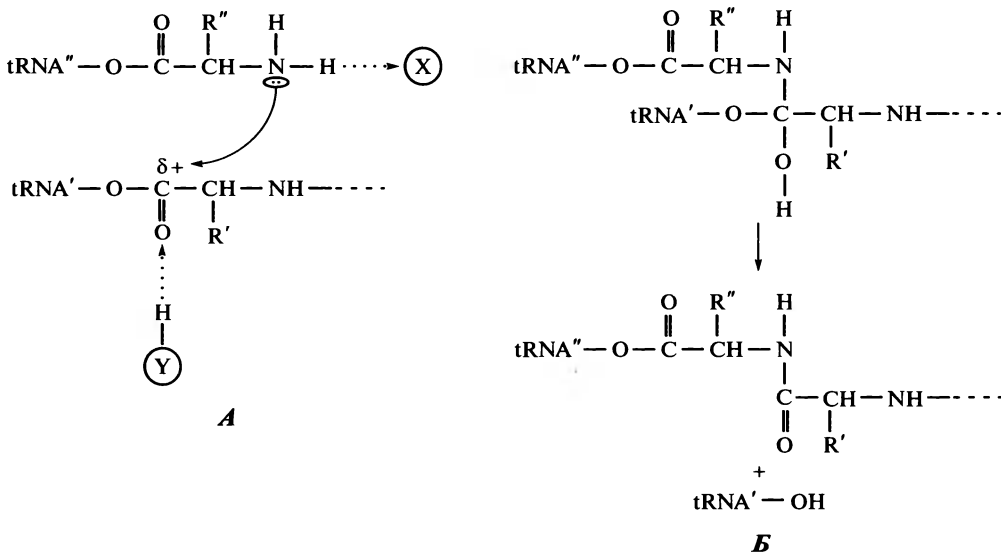


Рис. 10.1. Реакция транспептидации в терминах механизма S_N2 -нуклеофильного замещения.

А: нуклеофильная атака атома азота свободной аминогруппы аминоксил-тРНК на карбонильный углерод сложноэфирной связи пептидил-тРНК.

Б: тетраэдрический интермедиат, образующийся в результате атаки (А), и его распад на продукты реакции — пептидил-тРНК с удлинённым на один аминокислотный остаток полипептидом и деацилированную тРНК со свободными 2'- и 3'-гидроксилами

природу, в то время как другие группы окружения могут вносить вклад в протонирование карбонильного кислорода, усиливая электрофильные свойства атакующего углерода донорной сложноэфирной группы (рис. 10.1, А). Как бы это ни происходило, кажется несомненным, что реакция протекает в соответствии с механизмом S_N2 -нуклеофильного замещения через так называемый *тетраэдрический интермедиат* (см. рис. 10.1, Б).

10.2. Стереохимическое рассмотрение реакции

Для того чтобы понять молекулярный механизм транспептидации, катализируемой рибосомой, и начальную конформацию синтезируемого пептида, важно знать конформацию реагирующих субстратов, находящихся в ПТЦ рибосомы. На основании общих соображений о субстратной специфичности энзиматического катализа можно постулировать, что все типы аминокислотных остатков акцепторного субстрата, с одной стороны, и С-концевых аминокислотных остатков донорного субстрата — с другой, должны быть расположены и представлены друг другу в рибосомном ПТЦ стандартным (эквивалентным) образом, независимо от их типа. Используя этот принцип, можно попытаться сделать некоторые заключения о конформациях реагирующих субстратов на основе чисто стереохимического анализа.

Во-первых, следует принять во внимание, что рибосома катализирует транспептидацию с остатком пролина в качестве субстрата. В отличие от других аминокислот пролин имеет стерически ограниченный угол вращения вокруг связи $C^\alpha-N$, поскольку эта связь участвует в образовании кольцевой структуры. В случае реагирующего пролинового остатка в донорном субстрате это ограничение

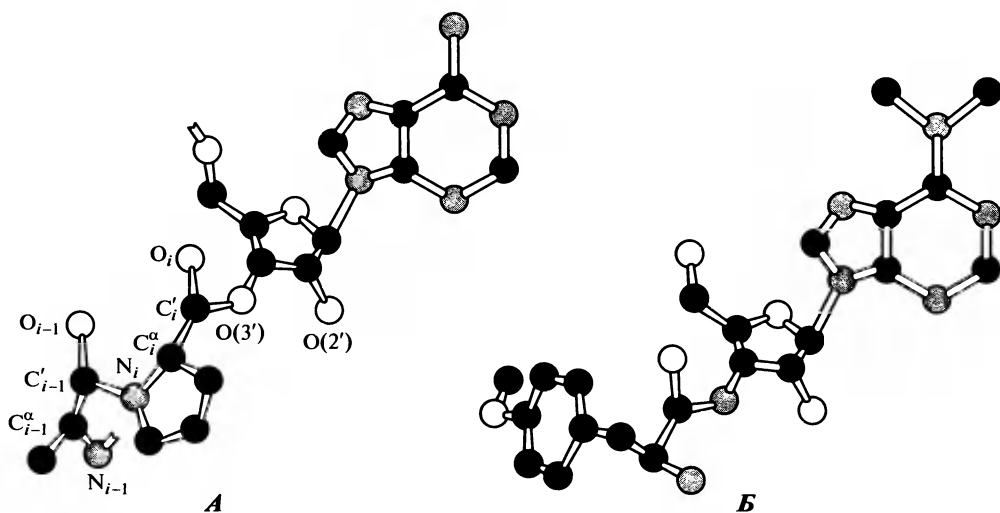


Рис. 10.2. Скелетные модели низкомолекулярных акцепторного и донорного субстратов пептидилтрансферазной реакции, катализируемой рибосомой.

А: аланилпролиладенозин — донорный субстрат пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосомы.

Б: пурамицин — акцепторный субстрат ПТЦ рибосомы.

Атомы углерода — черные кружки, азота — серые, кислорода — открытые белые; атомы водорода опущены

устанавливает фиксированный угол около 60° между плоскостью $N_i - C'_i - C_i$ и плоскостью $C'_{i-1} - N_i - C_i^\alpha$ (рис. 10.2, **А**). В пептидной химии угол, заданный вращением вокруг связи $C^\alpha - N$, обозначается как угол ϕ ; в рассматриваемом случае его значение принимается равным -60° , поскольку плоскость пептидной группы повернута на 60° против часовой стрелки, если смотреть со стороны атома C^α . Так как аминокислотный остаток должен быть расположен в ПТЦ стандартным образом, угол ϕ должен быть подогнан к тому же значению за счет вращения вокруг связи $C^\alpha - N$ и в случае любого из оставшихся других 19 аминокислотных остатков донорного субстрата (С-концевого остатка синтезируемого пептида, связанного с тРНК и участвующего в транспептидации).

Во-вторых, в качестве стандартной конформации акцепторного субстрата можно рассмотреть структуру путомицина (см. рис. 8.6, **А**), давно определенную с помощью рентгеноструктурного анализа его кристаллов (см. рис. 10.2, **Б**). Из химии реакции следует, что транспептидация включает нуклеофильную атаку аминогруппы акцепторного субстрата на атом углерода карбонильной группы донорного субстрата, реализуемую через механизм S_N2 -замещения. Известно, что при такой атаке орбиталь неподеленной пары электронов атома азота акцепторного субстрата направлена приблизительно перпендикулярно плоскости сложноэфирной группы донорного субстрата (рис. 10.3, **А**). Атака должна приводить к образованию промежуточного соединения, в котором валентные связи атакowanego карбонильного углерода C'_i ориентированы тетраэдрически (тетраэдрический интермедиат) (см. рис. 10.3, **Б**). Химическое окружение, которое способствует образованию тетраэдрического интермедиата в ПТЦ рибосомы, схематически показано на рис. 10.4 (см. также подразд. 8.3).

Следует отметить, что атакующая NH_2 -группа должна быть депротонирована, т.е. неподеленная пара электронов атома азота должна быть свободной. Таким

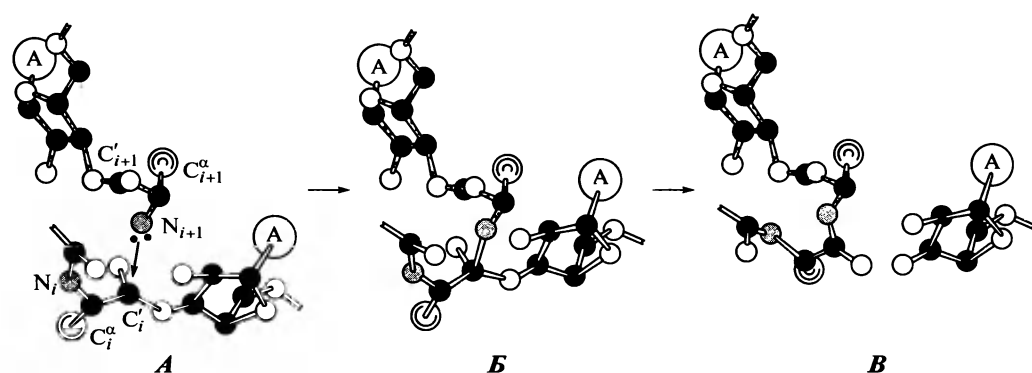


Рис. 10.3. Стереохимия реакции транспептидации в рибосоме.

А: взаимное расположение донорного (внизу) и акцепторного (сверху) субстратов в ПТЦ; атом азота акцепторного субстрата N_{i+1} атакует карбонильный углерод донорного субстрата C'_i .

Б: в результате атаки образуется тетраэдрический интермедиат.

В: в результате распада тетраэдрического интермедиата образуются продукты реакции — остаток удлиненного пептидаденозина и остаток деацилированного аденозина.

Обозначения и символы такие же, как на рис. 10.2. Атомы акцепторного аминокислотного остатка отмечены индексом $i + 1$, атомы С-концевого аминокислотного остатка — индексом i , **А** в кружке — остаток аденина 3'-концевых аденозинов тРНК донорного и акцепторного субстратов.

Lim and Spirin (1986) *J. Mol. Biol.* **188**: 565—574

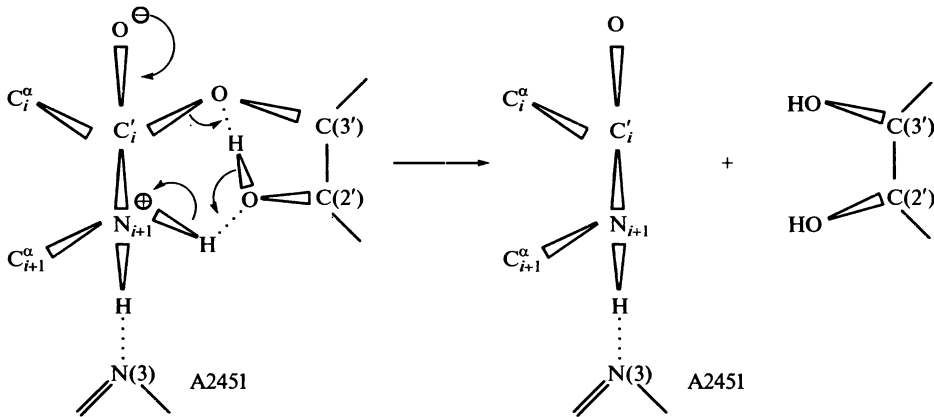


Рис. 10.4. Схематическое представление химического окружения, которое способствует образованию тетраэдрического интермедиата в ПТЦ рибосомы с последующим распадом интермедиата в результате спонтанного разрыва связи между C'_i и O при $C3'$

образом, химическое окружение в ПТЦ должно обеспечивать депротонирование аминоацильного остатка акцепторного субстрата. До образования пептидной связи атом азота обладает тремя валентными связями, которые направлены к вершинам тетраэдра, в то время как орбиталь неподеленной пары электронов направлена к четвертой вершине. Из стереохимического анализа следует, что во время нуклеофильной атаки свободная валентность атакующего атома азота должна иметь строго определенное направление: плоскость, сформированная этим направлением и связью $N_{i+1} - C^{\alpha}$, должна быть расположена под углом около 120° к плоскости $N_{i+1} - C^{\alpha}_{i+1} - C'_{i+1}$ акцепторного аминоацильного остатка (см. рис. 10.3, **A**); при любой другой ориентации нуклеофильная атака на карбонильную группу невозможна из-за стерических препятствий. После того как пептидная связь образована, во вновь добавленном аминоацильном остатке продукта устанавливается угол ϕ около -60° (см. рис. 10.3, **B**).

Если принять в рассмотрение все вышеизложенное, то стереохимический анализ показывает, что эффективная нуклеофильная атака в рибосомном ПТЦ может происходить только в случае, если угол между плоскостью сложноэфирной группы COO и плоскостью $C'_i - C^{\alpha}_i - N_i$, определяемый вращением вокруг связи $C^{\alpha}_i - C_i$ в атакуемом аминоацильном остатке донорного субстрата (пептидил-тРНК), составляет около 60° (см. рис. 10.3, **A**). После транспептидации он становится углом ψ с приблизительным значением -60° (вращение на 60° против часовой стрелки вокруг связи $C^{\alpha} - C'$, если смотреть со стороны атома C^{α}) (см. рис. 10.3, **B**). Таким образом, конформация донорного аминоацильного остатка в рибосомном ПТЦ должна быть подобна таковой аминоацильного остатка в α -спирали ($\phi = -60^\circ$, $\psi = -50^\circ$). Более того, акцепторный аминоацильный остаток атакует донорный остаток в такой ориентации, что реакция транспептидации приводит к элонгации скелета $N_i - C^{\alpha}_i - C'_i - N_{i+1} - C^{\alpha}_{i+1}$ с параметрами α -спиральной конформации.

Независимо от результата стереохимического анализа, правило эквивалентного (универсального) расположения любого аминокислотного остатка в рибосомном ПТЦ приводит к заключению, что вновь включенный в полипептидную цепь остаток должен приобретать некую стандартную конформацию своего остова, т.е.

стандартные значения торсионных углов φ и ψ . ПТЦ должен генерировать спиральную конформацию синтезируемого пептида. Таким образом, не удивительно, если пептид синтезируется в стерически и энергетически наиболее благоприятной спиральной конформации, такой как α -спираль (Лим и Спиринов, 1986). Этот теоретический вывод был подтвержден рядом экспериментальных данных, показавших, что растущий пептид в рибосоме действительно находится в α -спиральной конформации (см., например, Зив и др., 2005; Лю и Дойч, 2005). Впрочем, правило эквивалентного расположения аминокислотных остатков в ПТЦ в принципе допускает также и конформацию, соответствующую правой части β -структурной области карты Рамачандрана — области полипролиновой спирали. Однако α -спираль кажется значительно более предпочтительной по следующим дополнительным соображениям: 1) эта конформация жесткая, что и требуется для проталкивания растущего пептида сквозь рибосому; 2) α -спиральная конформация наиболее насыщена водородными связями и, следовательно, является наименее «липкой» структурой полипептида, что также важно для его прохождения через внутририбосомный туннель или вдоль поверхностного рибосомного канала; 3) в случае мембраносвязанных рибосом именно α -спиральная конформация растущего пептида совместима с ситуацией, когда он выходит из рибосомы непосредственно в мембрану эндоплазматического ретикулума (или плазматическую мембрану бактериальной клетки) и остается там в виде трансмембранной α -спирали (см. подразд. 17.1.5).

Таким образом, целый ряд аргументов приводит к предположению о существовании универсальной начальной конформации растущего пептида, задаваемой в ПТЦ. Наиболее вероятной начальной конформацией представляется α -спираль (хотя нельзя исключать и возможность первичной генерации в ПТЦ одиночной «полипролиновой» спирали с β -структурным взаиморасположением аминокислотных остатков и ее последующей перестройки в α -спираль вблизи ПТЦ). В ходе дальнейшего синтеза полипептидной цепи α -спиральная конформация может удерживаться и сохраняться в виде трансмембранных α -спиральных участков мембраносвязанного белка или перестраиваться в уникальную трехмерную структуру растворимого глобулярного белка. То, что сворачивание полипептидной цепи *in vivo* начинается, по-видимому, не из неупорядоченного состояния, а скорее является результатом перестройки универсальной спиральной структуры, может создавать уникальные возможности для быстрого и точного поиска конечных конформаций белковой молекулы.

10.3. Структурные основы катализа транспептидации

Рентгеноструктурные исследования рибосом со связанными субстратами реакции транспептидации и их аналогами, включая различные производные пуромицина как акцепторного субстрата, позволили локализовать истинные положения реагирующих групп субстратов в ПТЦ большой рибосомной субъединицы и взаимодействия этих групп с нуклеотидными остатками ПТЦ (Стайтц и др., 2000, 2002). Как указывалось в подразд. 8.3, концевые ССА-последовательности тРНК двух связанных субстратов — донорного (пептидил-тРНК) и акцепторного (аминоацил-тРНК) — фиксированы уотсон-криковскими взаимодействиями их цитидиловых остатков с гуаниловыми остатками G2251 и G2252 в *p*-участке ПТЦ (торцевая петля шпильки H80 — так называемая *P*-петля) и G2553 в *a*-участке

ПТЦ (торцевая петля шпильки H92 — так называемая А-петля; см. рис. 8, 1, а также 8.IV цв. вкл.). Обе ССА-связывающие шпильки ПТЦ пространственно сближены и направлены своими торцевыми петлями друг к другу, так что концевые аденозины, несущие реагирующие группы — карбонильный углерод сложноэфирной связи донорного субстрата и α -аминогруппа аминоацильного остатка акцепторного субстрата, — оказываются в непосредственном соседстве (см. рис. 8.IV цв. вкл.). Интересно, что хотя плоскости двух молекул тРНК расположены в рибосоме почти параллельно друг другу и соответственно их акцепторные черешки в А- и Р-участках также соотносятся друг с другом операцией трансляционного смещения (см. подразд. 8.5), ССА-концы этих тРНК (см. рис. 8.II цв. вкл.) развернуты так, что их ориентации соотносятся друг с другом как результат вращения почти на 180° . Это различие в относительных ориентациях ССА-концов и акцепторных черешков молекул тРНК в А- и Р-участках создается в основном за счет соответствующей фиксации цитидиловых остатков в ПТЦ путем вращений вокруг межнуклеотидных связей между нуклеотидными остатками 72 и 74. Концевые аденозины обеих тРНК тоже, по-видимому, фиксируются посредством так называемых А-минорных взаимодействий (см. подразд. 6.5, рис. 1.18) с РНК ПТЦ. Важный элемент ПТЦ — расположенный между его р- и а-участками остаток A2451 (см. рис. 10.I цв. вкл.): он оказывается в непосредственном контакте с α -аминогруппой аминоацильного остатка акцепторного субстрата, так что между его N3 и азотом аминогруппы возникает водородная связь.

Самая существенная особенность взаимного расположения донорного и акцепторного субстратов в ПТЦ состоит в том, что α -аминогруппа аминоацильного остатка акцепторного субстрата располагается почти вплотную к карбонильному углероду сложноэфирной связи донорного субстрата, т.е. к тому самому атому, который она должна атаковать для образования новой пептидной связи (см. рис. 10.I цв. вкл.). Другими словами, при таком расположении субстратов, диктуемом вышеописанными взаимодействиями в ПТЦ, все готово для нуклеофильной атаки, приводящей к транспептидации. Как уже указывалось в подразд. 10.1, основной вклад в катализ транспептидации вносит, по-видимому, именно этот ориентационный фактор — близкое и геометрически корректное пространственное взаиморасположение атакуемого и атакующего атомов двух субстратов реакции. Дополнительным фактором, ускоряющим реакцию, может быть упомянутое взаимодействие атакующего азота аминогруппы с азотом (N3) пуринового кольца A2451: N3, оттягивая протон от атакующей NH_2 -группы и тем самым усиливая ее нуклеофильную природу (см. подразд. 10.1), должен способствовать образованию тетраэдрического интермедиата.

Рентгеноструктурный анализ комплексов большой рибосомной субъединицы с синтетическим аналогом тетраэдрического интермедиата — производным пуромидина (CCdA-phosphate-puromycin; Шмеинг, Стайтц и др., 2002) — и с аналогами продуктов реакции транспептидации, при знании исходных позиций реагирующих групп субстратов в ПТЦ, позволил предложить экспериментально обоснованную модель всего процесса образования пептидной связи в рибосоме (см. рис. 10.II цв. вкл.). Исходное взаиморасположение субстратов реакции в ПТЦ рибосомы, показанное на рис. 10.II, А цв. вкл., обеспечивает необходимую близость атакующего атома азота аминогруппы акцепторного субстрата (азот связан водородными связями с N3 аденина рРНК и O2' рибозы концевого аденозина донорного субстрата) с карбонильным углеродом (имеющим тригональную ориентацию валентных связей в одной плоскости) сложноэфирной группы донорно-

го субстрата. Кроме того, взаиморасположение субстратов обеспечивает направление атаки приблизительно перпендикулярно плоскости сложноэфирной группы. На рис. 10.П, **Б** цв. вкл. показано расположение образованного тетраэдрического интермедиата в ПТЦ рибосомы. Видно, что в результате атаки не происходит сколько-нибудь существенных пространственных сдвигов рибосомного окружения субстратов и групп, непосредственно не участвующих в реакции. Распад тетраэдрического интермедиата и появление продуктов реакции в ПТЦ (рис. 10.П, **В** цв. вкл.) также не приводят к немедленным существенным изменениям окружения и взаиморасположения продуктов по сравнению с исходными субстратами. Во всяком случае такова картина, выводимая непосредственно из экспериментальных данных.

10.4. Спонтанное посттранспептидационное смещение продуктов транспептидации как предпосылка транслокации

Итак, согласно данным рентгеноструктурного исследования рибосом с модельными аналогами донорного и акцепторного субстратов ПТЦ (Стайтц и др., 2002; Шмеинг, Стайтц и др., 2002), непосредственно по завершении реакции транспептидации продукты реакции сохраняют позиции субстратов, из которых они произошли: *p*-участок ПТЦ, где был ССА-конец тРНК с атакуемой сложноэфирной группой донорного субстрата, остается связанным с деацилированным ССА-концом этой же тРНК; *a*-участок ПТЦ оказывается заполнен ССА-концом, несущим пептидный остаток новоудлиненной пептидил-тРНК (рис. 10.5; см. также рис. 10.П, **В** цв. вкл.).

Следует отметить, что в более ранних исследованиях рибосомы после реакции транспептидации методом фут-принтинга (Ноллер и др., 1986; см. также обзоры: Noller, H.F., et al., 1990; Noller, H.F., 1991) деацилированная тРНК, занимающая *P*-участок на 30S субъединице, не защищала от модификаций нуклеотидные остатки *p*-участка ПТЦ, а защищала остатки, характерные для *e*-участка (Моазед и Ноллер, 1989). В то же время пептидил-тРНК, занимая *A*-участок на 30S субъ-

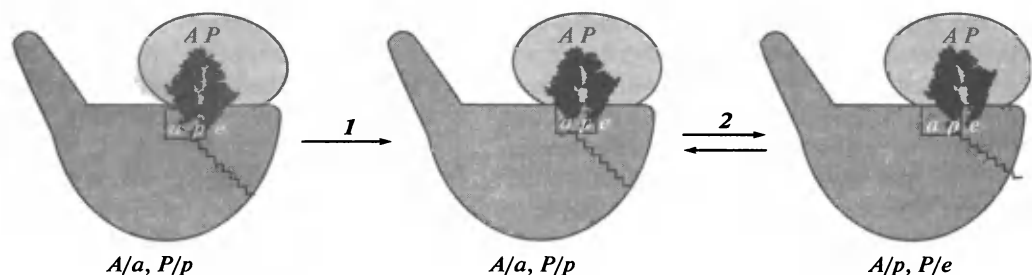


Рис. 10.5. Схема стадии транспептидации, катализируемой рибосомой.

1: транспептидация.

2: перемещение 3'-концов тРНК.

Показано расположение 3'-концов остатков тРНК донорного и акцепторного субстратов в *a*- и *p*-участках 50S рибосомной субъединицы перед прохождением реакции транспептидации (слева), непосредственно после ее прохождения (в середине) и в результате последующего спонтанного смещения (справа). В результате транспептидации и смещения концов тРНК устанавливается нестабильное претранслокационное состояние рибосомы, когда пептидил-тРНК временно занимает «гибридное» положение *A/p*, а деацилированная тРНК — положение *P/e* (где *e* — за пределами ПТЦ)

единице, защищала остатки, характерные для *p*-участка на 50S субъединице. Другими словами, хотя остатки тРНК занимали те же позиции в *A*- и *P*-участках рибосомы, которые были до транспептидации, их ССА-концы оказывались сдвинутыми: деацелированный ССА-конец тРНК, сидящей в *P*-участке, вообще был удален из ПТЦ и перешел в *e*-участок на большой субъединице, а ССА-конец с новообразованной сложноэфирной группой передвинулся в *p*-участок ПТЦ. Это может означать, что ситуация в ПТЦ после реакции транспептидации, отображенная на рис. 10. II цв. вкл., не стабильна, и ССА-концы двух тРНК могут претерпевать спонтанное локальное перемещение еще до транслокации самих тРНК. Указанное смещение сильно зависит от концентрации ионов магния. Спонтанная транслокация продуктов в районе ПТЦ на большой субъединице, без транслокации самих остатков тРНК, может рассматриваться как начальный этап стадии транслокации.

Рассмотрение стереохимии реакции транспептидации (см. рис. 10.3) дает дополнительный аргумент в пользу утверждения, что за распадом тетраэдрического интермедиата должно следовать смещение деацелированной рибозной группы: для предотвращения обратимости распада интермедиата и, тем самым, обратимости транспептидации в рибосоме деацелированная группа, как один из продуктов реакции, должна уводиться из места реакции. Удаление продукта, вероятно, и является функцией *e*-участка, который закрепляет конец молекулы деацелированной тРНК вне ПТЦ. Одновременно вновь образованная пептидная группа с новым С-концевым аминокислотным остатком и сложноэфирной группой должны стремиться переместиться из *a*-участка ПТЦ в освобождаемый *p*-участок ПТЦ в силу их высокого взаимного сродства (в частности, благодаря образованию двух пар G:C с рРНК ПТЦ вместо одной — см. рис. 8. IV цв. вкл.).

Таким образом, можно предложить следующую схему последовательности событий на стадии транспептидации элонгационного цикла (см. рис. 10.5).

1. В рибосоме до реакции транспептидации молекула пептидил-тРНК, связанная в *P*-участке, своим ССА-концом взаимодействует с нуклеотидными остатками рРНК *p*-участка в ПТЦ на 50S субъединице, а аминоацил-тРНК, связанная в *A*-участке, специфически экранирует нуклеотидные остатки *a*-участка ПТЦ (исходное состояние *A/a*, *P/p*, см. рис. 10.5, *слева*).

2. Непосредственно после реакции транспептидации обе тРНК и их концы в ПТЦ могут временно занимать свои прежние положения, т.е. сохранять состояние *A/a*, *P/p*, хотя теперь *A*-участок удерживает удлиненную на один остаток пептидил-тРНК, а *P*-участок — деацелированную тРНК (промежуточное состояние *A/a*, *P/p*, см. рис. 10.5, *в середине*).

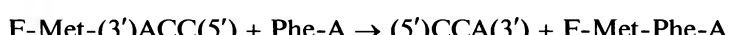
3. Такое состояние, однако, термодинамически неустойчиво, и концы обеих тРНК могут спонтанно перемещаться так, что деацелированный конец связанной в *P*-участке тРНК вытесняется из ПТЦ и улавливается *e*-участком, в то время как эстерифицированный конец связанной с *A*-участком тРНК сдвигается в пределах ПТЦ из *a*-участка в *p*-участок (см. рис. 10.5, *справа*). По всей вероятности, между состояниями с исходными и сдвинутыми 3'-концами тРНК устанавливается динамическое равновесие. Фактически, эти локальные перемещения 3'-концов тРНК в рибосоме представляют собой первую фазу следующей стадии элонгационного цикла — транслокации (см. гл. 11). Очевидно, что гибкость и подвижность ССА-концов молекул тРНК относительно остальной части тРНК чрезвычайно важна в вышеупомянутых посттранспептидационных перемещениях концов тРНК на большой субъединице рибосомы.

10.5. Энергетический баланс реакции

Стандартная свободная энергия гидролиза сложноэфирной связи между тРНК и карбонильной группой аминоацильного или пептидильного остатка ΔG° составляет около -7 — -8 ккал/моль. Стандартная свободная энергия гидролиза пептидной связи в полипептиде равна приблизительно $-0,5$ ккал/моль. Таким образом, если бы субстраты реакции приходили непосредственно из раствора и ее продукты освобождались в раствор, суммарный выигрыш свободной энергии реакции транспептидации в стандартных условиях должен бы составлять около $-6,5$ — $-7,5$ ккал/моль:



Такой формальный расчет часто выдвигается как аргумент в пользу утверждения, что рибосомная транспептидация полностью обеспечивается свободной энергией и, следовательно, является термодинамически спонтанной. Нужно отметить, однако, что такой подход имеет реальный смысл лишь в случаях модельных реакций, катализируемых рибосомой, между растворенными в среде низкомолекулярными субстратами — например, между тринуклеотидом ССА с формилметионильным остатком на 3'-гидроксиле рибозы концевое аденозина (донорный субстрат) и аденозином с фенилаланильным остатком на 3'-гидроксиле его рибозы (акцепторный субстрат):



Здесь субстраты входят в ПТЦ рибосомы непосредственно из раствора и продукты немедленно и спонтанно освобождаются в раствор.

В цикле элонгации, однако, один из субстратов (донорный) всегда ассоциирован с рибосомой, в то время как другой (акцепторный) попадает в ПТЦ из предварительно связанного состояния. Более того, один из реакционных продуктов (пептидил-тРНК) не освобождается в раствор до тех пор, пока трансляция не закончится, а другой продукт (деацилированная тРНК) освобождается не в результате транспептидации, а лишь на следующей стадии элонгационного цикла. Все это делает невозможной даже приблизительную оценку изменения свободной энергии в ходе реакции транспептидации, происходящей в процессе нормального рибосомного цикла элонгации. Конечно, поскольку реакция происходит быстро, можно предположить значительное уменьшение свободной энергии рибосомного комплекса в процессе транспептидации. Однако это изменение должно быть значительно меньше -7 ккал/моль в стандартных условиях. С одной стороны, свободная энергия гидролиза связанного субстрата, при условии, что продукты освобождаются, должна быть ниже, чем в случае свободного субстрата, поскольку некоторая порция энергии должна была освободиться при связывании, если связывание было термодинамически спонтанным. Кроме того, свободная энергия гидролиза субстрата, при условии сохранения продукта в связанном состоянии, должна быть ниже, чем в случае, когда продукт покидает комплекс, поскольку связанное состояние продукта сопряжено с аккумуляцией свободной энергии, если освобождение продукта в принципе термодинамически спонтанно. Можно думать, что свободная энергия около -7 ккал/моль, которая должна бы быть освобождена при транспептидации, если бы субстраты и продукты были свободны, в действительности частично распределяется на предшествующую ста-

дию связывания аминоксил-тРНК и последующую стадию транслокации, тем самым обеспечивая протекание всего цикла элонгации.

10.6. Ингибиторы

Были описаны многочисленные специфические ингибиторы пептидилтрансферазной реакции, катализируемой прокариотическими или эукариотическими рибосомами (см. монографию Gale, E. F., et al., 1981; обзоры: Pestka, S., 1977; Kravetsky, A. A., and Kukhanova, M. K., 1979; Garrett, R. A., and Rodriguez-Fonseca, C., 1991). Как и следовало ожидать, все ингибиторы имеют своей мишенью большую (50S или 60S) рибосомную субъединицу. Многие антибиотики, обычно используемые для лечения бактериальных инфекций, являются ингибиторами пептидилтрансферазы прокариотической 70S рибосомы и не действуют на эукариотические 80S рибосомы.

10.6.1. Хлорамфеникол

Хлорамфеникол (известный также как хлоромитетин или левомитетин) — наиболее хорошо охарактеризованный ингибитор пептидилтрансферазного цен-

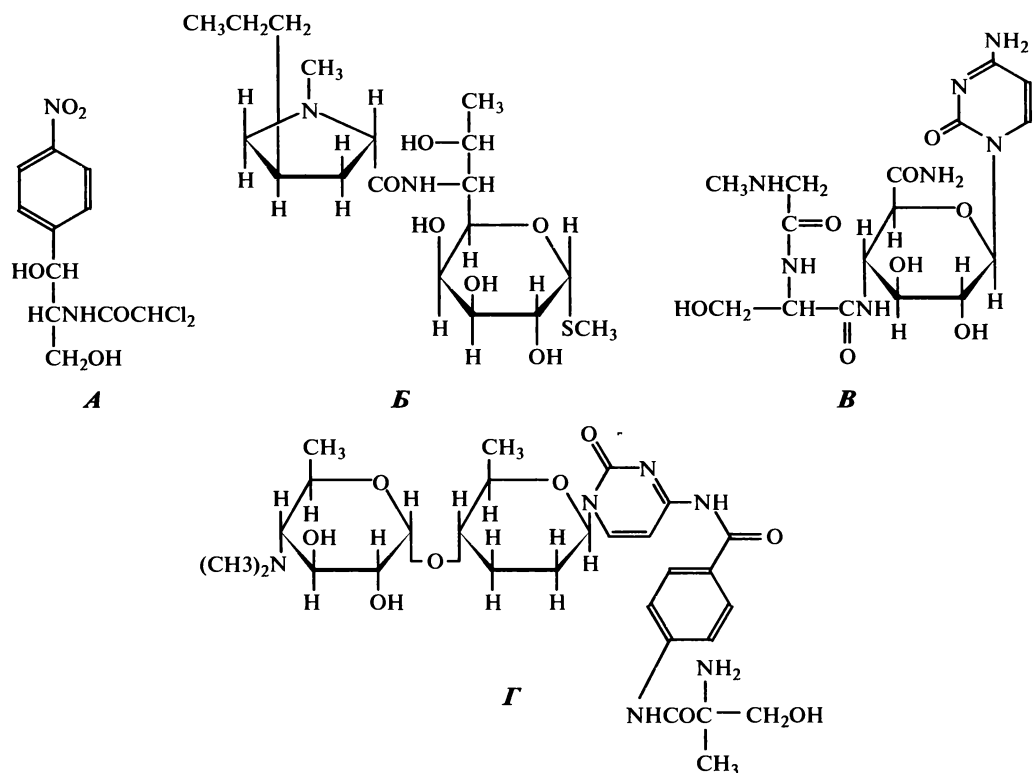


Рис. 10.6. Антибиотики — прямые ингибиторы пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) бактериальной рибосомы.

A: хлорамфеникол. *B:* линкомицин. *V:* гугертин. *G:* амицитин

5S РНК

L7/L12

L1

Эритромицин

Хлорамфеникол

Рис. 10.7. Локализация участков связывания хлорамфеникола и эритромицина в районе ПТЦ на контактирующей поверхности 50S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 1K01 (хлорамфеникол) и 1JZY (эритромицин). Schlünzen et al. (2001) *Nature* **413**: 814–821

тра 70S рибосом (рис. 10.6, А). Это бактериостатический антибиотик широкого спектра действия, часто используемый в фармакологической практике. Он не действует на эукариотические 80S рибосомы, но может атаковать митохондриальные рибосомы эукариот. Антибиотик связывается с 70S рибосомой и ее изолированной 50S субъединицей непрочной и может быть легко отмыт от частиц. Соответственно действие антибиотика обратимо.

Антибиотик связывается в области ПТЦ, хотя прямо не взаимодействует ни с *P*-петлей, ни с *A*-петлей, удерживающих соответственно донорный и акцепторный субстраты (см. подразд. 10.3 и рис. 8.IV цв. вкл.). Согласно данным по защите нуклеотидов от химической атаки и по мутационным заменам, приводящим к устойчивости против антибиотика, основные точки его взаимодействия сосредоточены в межшпильчатых районах «ПТЦ-кольца» — в участках цепи G2057–A2062, G2447–C2452 и U2500–U2506 (см. рис. 8.7). Следует отметить, что A2451, непосредственно взаимодействующий с аминокислотной группой акцепторного субстрата (см. рис. 10.4 и рис. 10.I цв. вкл.), защищается хлорамфениколом от химической атаки, а его мутационная замена приводит к устойчивости против антибиотика. На рис. 10.7 и рис. 10.III цв. вкл. показано расположение молекулы хлорамфеникола, совпадающее с позицией ПТЦ на 50S субъединице рибосомы (ср. с рис. 8.II цв. вкл.). В целом многочисленные данные указывают на то, что хлорамфеникол блокирует взаимодействие акцепторного субстрата с *a*-участком в ПТЦ. Пуромидин и 3'-концевые фрагменты аминоацил-tРНК конкурируют с хлорамфениколом за связывание с ПТЦ.

По химической структуре хлорамфеникол представляет собой аналог N-блокированного аминспирта с ароматическим радикалом. Дихлорметильная группа не обязательна для проявления активности и может быть заменена на многие умеренно массивные радикалы. Ароматическая нитрогруппа также может быть заменена рядом других электроотрицательных групп без потери активности антибиотика. Амидная связь и стереохимия группировки CO–NH с прилегающими атомами заслуживают внимания в связи с механизмом действия антибиотика: эта часть молекулы хлорамфеникола может имитировать пептидную группу с прилегающим C^α-атомом и боковым радикалом. Поэтому можно было бы думать, что хлорамфеникол является неактивным аналогом акцепторного субстрата и конкурентно препятствует взаимодействию ПТЦ с настоящими акцепторными субстра-

тами. Однако имеются свидетельства скорее в пользу конкурентного способа ингибирования транспептидации хлорамфениколом.

10.6.2. Линкозамиды

Линкозамиды — бактериостатические антибиотики, широко используемые в терапии. Эта группа соединений включает линкомицин (см. рис. 10.6, **Б**) и его производные, такие как клиндамицин и целестицетин. Они специфически действуют на эубактериальные 70S рибосомы. Химическая структура линкомицина, клиндамицина и целестицетина имеет некоторые общие черты со структурой хлорамфеникола: все эти антибиотики содержат амидную связь и группу, имитирующую пептидную группировку (CO—NH) по соседству с C^α-атомом аминокислотного остатка (здесь также вместо кислотной группировки присутствует гидроксильная группа спирта). Интересно, что они конкурируют с хлорамфениколом за связывание с рибосомой. Соответственно мутации в 23S рРНК, которые придают резистентность против линкозамидов, и остатки, защищаемые связанными антибиотиками от химической атаки, локализируются в тех же межспилечных областях «ПТЦ-кольца», что и места связывания хлорамфеникола (G2057 - G2061, A2451 и G2505). Согласно рентгеноструктурным данным, расположение молекулы клиндамицина на контактирующей поверхности 50S субъединицы в ПТЦ рибосомы практически совпадает с расположением хлорамфеникола. Механизм действия линкомицина и его производных, по-видимому, подобен таковому хлорамфеникола, хотя при связывании с ПТЦ углеводоподобное кольцо линкозамидов выходит за пределы *a*-участка, так что эти антибиотики могут действовать не только на *a*-, но и на *p*-участок ПТЦ.

10.6.3. 4-Аминогексозопиримидиннуклеозидные антибиотики

К 4-аминогексозопиримидиннуклеозидным антибиотикам относятся такие ингибиторы рибосомной транспептидации, как гугеротин (см. рис 10.6, **В**), амицетин (см. рис. 10.6, **Г**), бластицидин S и бамицетин. Антибиотики этой группы имеют нуклеозидную структуру и могут рассмариваться как аналоги 3'-концевого аденозина тРНК. Кроме того, в гугеротине и бластицидине S присутствует тот же структурный мотив, что в хлорамфениколе и линкомицине, а именно — пептидная группа с примыкающим C^α-атомом. 4-Аминогексозопиримидиннуклеозидные антибиотики действуют на бактериальные рибосомы, хотя некоторые из них, такие как гугеротин и бластицидин S, могут ингибировать также рибосомы эукариот. Все эти антибиотики связываются с 50S субъединицей рибосомы и, по-видимому, ингибируют взаимодействие между акцепторным субстратом и ПТЦ рибосомы. Интересно, что связывание этих антибиотиков стимулирует взаимодействие низкомолекулярных аналогов донорного субстрата с ПТЦ. Разные антибиотики рассматриваемой группы конкурируют друг с другом и, по-видимому, обладают аналогичным механизмом действия.

Мутационные замены, придающие резистентность к амицетину, были обнаружены в положении U2438 спирали H74 при «ПТЦ-кольце». Эта позиция не совпадает с позициями мутаций, обеспечивающих резистентность к антибиотикам других групп. Таким образом, механизм действия рассматриваемых антибиотиков,

возможно, принципиально отличается от механизма действия линкозамидов, макролидов и стрептограмин и может быть конкурентным.

10.6.4. Макролиды

Макролидные антибиотики содержат большое (от 12 до 16 атомов) лактонное кольцо с одним или более боковыми заместителями в виде остатков сахаров. Эритромицин (рис. 10.8) и его производные (кларитромицин, рокситромицин и азитромицин) наиболее известны и широко используются в фармацевтической практике. Другие антибиотики этого класса включают олеандомицин, карбомицин, чалкомицин, ниддамицин, тилозин и спирамицин. Макролидные антибиотики специфически действуют на рибосомы прокариот и ингибируют трансляцию. Их связывающий центр расположен на большой (50S) субъединице рибосомы, причем они конкурируют друг с другом за связывание с рибосомой. Связывающий центр макролидов расположен в области ПТЦ, они конкурируют с хлорамфениколом, классическим ингибитором пептидилтрансферазы, и защищают нуклеотидные остатки в тех же межшпилечных районах «ПТЦ-кольца», что и хлорамфеникол (A2058 - A2062, A2451, G2505). Резистентность к эритромицину придается мутациями в указанных районах. Интересно, что резистентность к макролидам, а также к линкозамидам и антибиотикам группы стрептограмина В обеспечивается N⁶-диметилированием или N⁶-мометилированием A2058, и этот же механизм защиты от антибиотиков присущ продуцентам рассматриваемых антибиотиков. Рентгеноструктурный анализ показал, что молекула связанного эритромицина находится в окружении в основном межшпилечных остатков A2058, A2059, A2062, U2609, C2610 и G2505 «ПТЦ-кольца». Положение эритромицина на контактирующей поверхности 50S субъединицы рибосомы в районе ПТЦ, рядом с местом связывания хлорамфеникола (но без перекрытия одного другим!), показано на рис. 10.7 и рис. 10.III цв. вкл.

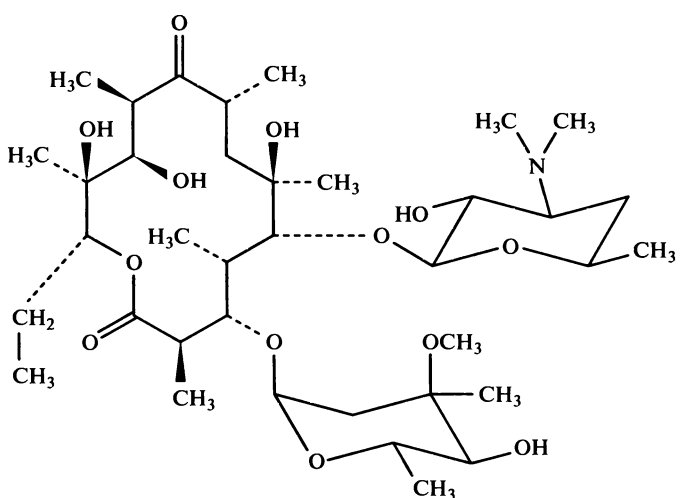


Рис. 10.8. Эритромицин.

На этом и последующих рисунках гл. 10 пунктирными линиями обозначены ковалентные связи, направленные от зрителя, а клиновидными — к зрителю

В то же время макролидные антибиотики — во всяком случае антибиотики группы эритромицина и его производных — не являются прямыми ингибиторами связывания субстратов реакции или самой реакции транспептидации в ПТЦ. Было показано, что в определенных условиях *in vitro* эритромицин может даже усиливать связывание донорного субстрата и стимулировать образование пептидной связи. Были сообщения о действии эритромицина на способность рибосомы удерживать продукты транспептидазной реакции (например, ингибировать освобождение деацелированной тРНК). С другой стороны, было показано воздействие эритромицина на растущий пептид (ингибирование его роста). На основе доступных данных можно полагать, что связанный с рибосомой эритромицин не перекрывает участки связывания субстратов в ПТЦ, а скорее находится на пути перемещений вновь сформированной пептидной группы и соседней С-концевой части растущего пептида непосредственно после транспептидации (см. подразд. 10.4).

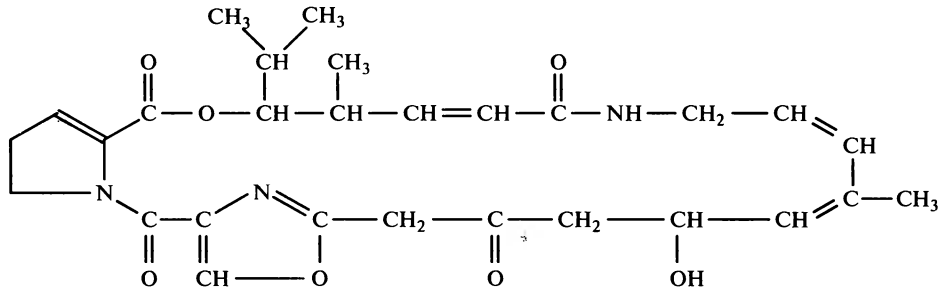
10.6.5. Стрептограмин А

Стрептограмины и родственные антибиотики продуцируются видами *Streptomyces* как комплекс двух различных компонентов, называемых А (или М) и В (или S). Компоненты А и В вместе демонстрируют значительный синергизм в действии на бактериальный синтез белка.

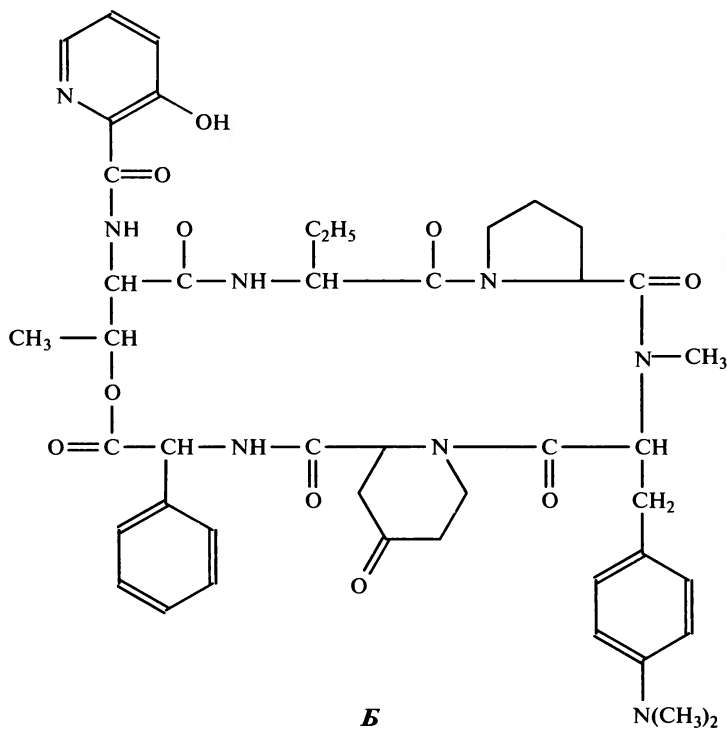
Стрептограмин А (рис. 10.9, А) и родственные ему антибиотики виргиниамицин М и гризевириндин представляют собой большое кольцо непептидной природы, включающее в себя несколько ненасыщенных С=C-связей и амидные, имидные и сложноэфирные группы. Эти антибиотики прочно связываются с бактериальными рибосомами и специфически с их большой (50S) субъединицей. Длинные растущие пептиды в рибосоме препятствуют их связыванию. Соответственно антибиотики группы стрептограмина А ингибируют пурамициновую реакцию с короткими донорными субстратами, но не формирование пептидилпурамицина на полисомных рибосомах. Антибиотики группы стрептограмина А препятствуют связыванию хлорамфеникола с рибосомами и 50S рибосомными субъединицами. В то же время они облегчают связывание антибиотиков группы В (см. далее) с рибосомами бактерий. Таким образом, между антибиотиками групп А и В наблюдается синергизм; резонно предположить, что их мишени не перекрываются и механизмы их действия различны. Более детальных сведений о механизме действия этой группы антибиотиков пока нет, но предполагается, что они так или иначе блокируют или нарушают как *a*-, так и *p*-участок ПТЦ бактериальной рибосомы.

10.6.6. Стрептограмин В

Стрептограмин В и родственные антибиотики, такие как виргиниамицин S, доридин, этамицин (виридогризеин), химически отличаются от соединений группы стрептограмина А. Они являются циклическими гексадепсипептидами, содержащими необычные аминокислотные остатки (см. рис. 10.9, Б). Эти антибиотики прочно связываются с 70S рибосомами эубактерий и их 50S субъединицами, но не с 80S рибосомами зукариот. Соответственно, они специфически ингиби-



A



B

Рис. 10.9. Стрептограмини.
A: стрептограмин А. **Б:** стрептограмин В

руют синтез белка в прокариотических системах, включая митохондрии и хлоропласты, как *in vivo*, так и *in vitro*. Мишень их действия — ПТЦ. Однако, как и макролиды, они не всегда ингибируют реакцию транспептидации в модельных условиях и иногда даже стимулируют связывание акцепторных и/или донорных субстратов с ПТЦ. К тому же их способность связываться с мишенью и ингибиторный эффект могут зависеть от присутствия и длины образующегося полипептида. Вероятно, эта группа антибиотиков действует подобно макролидам, и их основной ингибиторный эффект также может быть обусловлен тем, что они препятствуют перемещению или установке С-концевой части растущего пептида непосредственно после транспептидации (см. подразд. 10.4).

Следует отметить, что стрептограмин В влияет на химическую реакционно-способность нуклеотидных остатков тех же межшпильчатых областей «ПТЦ-коль-

ца» 23S рРНК, которые известны как экранируемые (или иногда экспонируемые) при действии хлорамфеникола, линкозамидов и макролидов, а именно А2058, А2062, А2451 и G2505. (Кроме того, стрептограмин В защищает А2439 в боковой петле спирали Н74 при «ПТЦ-кольце» и А752 в домене II 23S рРНК.) Мутационные замены А2058 также вызывают резистентность как к стрептограмину В, так и к хлорамфениколу, линкозамидам и макролидам. Приведенные факты дают основание полагать, что несмотря на очень различную химическую структуру всех обсуждаемых антибиотиков, они связываются в пределах одной области ПТЦ, и для них характерно образование ряда идентичных контактов с межшпильчечными районами «ПТЦ-кольца». Это свидетельствует об общей структурной основе их механизмов действия на бактериальные рибосомы.

10.6.7. Спарсомицин

Спарсомицин является очень мощным антибиотиком широкого спектра действия. Он останавливает трансляцию как в прокариотических (включая архебактерии), так и в эукариотических системах. Более конкретно он ингибирует пептидилтрансферазную активность 70S и 80S рибосом и их изолированных больших субъединиц. Химическая структура спарсомицина приведена на рис. 10.10; видно, что он содержит пиримидиновый (урацил-подобный) остаток, амидную группу и сульфоксидную группу, которая может быть существенна для его ингибиторной активности. Механизм действия этого соединения необычен и отличается от такового для рассмотренных выше антибиотиков. Прежде всего, спарсомицин не способен прочно связываться с рибосомой или изолированной большой субъединицей в отсутствие донорного субстрата (пептидил-тРНК или его укороченных производных). Связывание антибиотика и донорного субстрата синергично: наличие донорного субстрата в *p*-участке ПТЦ необходимо для связывания антибиотика, а антибиотик стимулирует связывание донорного субстрата с рибосомой и закрепляет его в *p*-участке ПТЦ. Другие антибиотики, связывающиеся с ПТЦ рибосомы, такие как хлорамфеникол и линкомицин, подавляют действие спарсомицина. Будучи связанным, спарсомицин блокирует взаимодействие акцепторного субстрата (аминоацил-тРНК или пуромицина) с *a*-участком ПТЦ. Действительно, согласно рентгеноструктурным данным (Хансен, Стайтц и др., 2002), антибиотик, связанный с рибосомой, несущей пептидил-тРНК, прочно взаимодействует с СА-концом донорного субстрата, а выпетленный (эволюционно консервативный) остаток А2602 спирали Н93 взаимодействует с урацил-подобной группой антибиотика с другой стороны, тем самым несколько перестраивая конформацию ПТЦ и блокируя доступ акцепторного субстрата к *a*-участку. Кроме того, прочно связываясь с пептидной группой донорного субстрата, спарсомицин фиксирует его в пределах ПТЦ в исходной конформации и

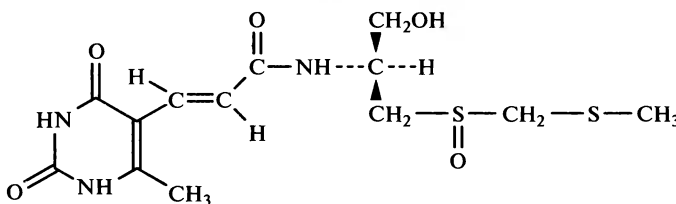


Рис. 10.10. Спарсомицин

предотвращает формирование переходного комплекса (тетраэдрического интермедиата), блокируя таким образом стадию $A \rightarrow B$ реакции транспептидации (см. рис. 10.3).

В связи с вышеизложенным представляет интерес обнаруженное свойство антибиотика стимулировать бесфакторную («неэнзиматическую») транслокацию (см. подразд. 11.3 и рис. 11.5) при связывании с претранслокационной рибосомой (Фредрик и Ноллер, 2003). Это значит, что антибиотик не просто стабилизирует связывание пептидил-тРНК в ПТЦ рибосомы, но и индуцирует такую конформацию ПТЦ и, возможно, его окружения, которая совместима лишь с посттранслокационным состоянием. Антибиотики, ингибирующие нормальную EF-G-катализируемую транслокацию, — виомицин, спектиномицин, стрептомицин, неомицин (см. подразд. 11.6.1 и 11.6.2), ингибируют также и «неэнзиматическую» транслокацию, вызываемую спарсомицином.

10.6.8. Анизомицин

Анизомицин (рис. 10.11) специфически ингибирует транспептидацию в рибосомах эукариот, а также в рибосомах архебактерий. Он связывается с 60S субъединицей рибосомы в области ПТЦ. По-видимому, анизомицин мешает взаимодействию акцепторного субстрата с a -участком ПТЦ. Он ингибирует пурамициновую реакцию в рибосомах эукариот и их 60S субъединице *in vitro*. *In vivo* анизомицин является мощным ингибитором стадии транспептидации, он может полностью блокировать элонгацию, останавливая перемещение рибосом вдоль мРНК, и таким образом «замораживает» полирибосомы. В целом этот антибио-

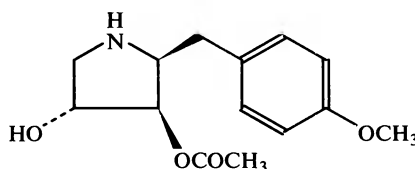


Рис. 10.11. Анизомицин

тик можно рассматривать как эукариотический эквивалент хлорамфеникола. Мутации, придающие резистентность к анизомицину, были идентифицированы в части рибосомной РНК, находящейся в пределах «ПТЦ-кольца», и их позиции более или менее эквивалентны позициям мутаций, придающих резистентность к хлорамфениколу и другим ингибиторам ПТЦ в 23S рРНК прокариотических рибосом — например, G2447, C2452 и A2453.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 10

- Fahnestock, S., Neumann, H., Shashoua, V., and Rich, A. (1970). Ribosome-catalysed ester formation. *Biochemistry* **9**: 2477 — 2483.
- Fredrick, K., and Noller, H.F. (2003). Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin. *Science* **300**: 1159 — 1162.
- Gooch, J., and Hawtrey, A.O. (1975). Synthesis of thiol-containing analogues of puromycin and a study of their interaction with N-acetylphenylalanyl-transfer ribonucleic acid on ribosomes to form thioesters. *Biochem. J.* **149**: 209 — 220.

- Hansen, J. L., Schmeing, T. M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002). Structural insights into peptide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11670—11675.
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**: 142—148.
- Lim, V. I., and Spirin, A. S. (1986). Stereochemical analysis of ribosomal transpeptidation: Conformation of nascent peptide. *J. Mol. Biol.* **188**: 565—574.
- Lu, J., and Deutsch, C. (2005). Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nature Struct. Mol. Biol.* **12**: 1123—1129.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**: 920—930.
- Schmeing, T. M., Seila, A. C., Hansen, J. L., Freeborn, B., Soukup, J. K., Scaringe, S. A., Strobel, S. A., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2002). A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nature Struct. Biol.* **9**: 225—230.
- Stern, S., Moazed, D., and Noller, H. F. (1986). Analysis of RNA structure using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension. *Methods Enzymol.* **164**: 481—489.
- Tarussova, N. B., Jacovleva, G. M., Victorova, L. S., Kukhanova, M. K., and Khomutov, R. M. (1981). Synthesis of an unnatural P[±]N bond catalysed with *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Letters* **130**: 85—87.
- Victorova, L. S., Kotusov, L. S., Azhayev, A. V., Krayevsky, A. A., Kukhanova, M. K., and Gottikh, B. P. (1976). Synthesis of thioamide bond catalysed by *E. coli* ribosomes. *FEBS Letters* **68**: 215—218.
- Ziv, G., Haran, G., and Thirumalai, D. (2005). Ribosome exit tunnel can entropically stabilize α -helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 18956—18961.
- Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H., and Waring, M. J. (1981). *The Molecular Basis of Antibiotic Action*. John Wiley & Sons, London.
- Garrett, R. A., and Rodriguez-Fonseca, C. (1995). The peptidyl transferase center. In *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing & Function in Protein Synthesis* (eds. Zimmermann, R. A., and Dahlberg, A.), pp. 329—357. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Green, R., and Noller, H. F. (1997). Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 679—716.
- Krayevsky, A. A., and Kukhanova, M. K. (1979). The peptidyl-transferase center of ribosomes. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **23**: 1—51.
- Monro, R. E., Staehelin, T., Celma, M. L., and Vazquez, D. (1969). The peptidyl transferase activity of ribosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 357—366.
- Noller, H. F., Moazed, D., Stern, S., Powers, T., Allen, P. N., Robertson, J. M., Weiser, B., and Triman, K. (1990). Structure of rRNA and its functional interactions in translation. In *The Ribosome: Structure, Function and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 73—92. ASM Press, Washington, D. C.
- Noller, H. F. (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 191—227.
- Pestka, S. (1977). Inhibitors of protein synthesis. In *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* (eds. Weissbach, H., and Pestka, S.), pp. 468—553. Academic Press, New York.

11.1. Определения и экспериментальные термины

Согласно элонгационному циклу транслирующей рибосомы (см. рис. 8.3), вслед за стадией транспептидации следует стадия транслокации. На рис. 11.1 схематически представлены состояния рибосомы сразу после реакции транспептидации — так называемое *претранслокационное* состояние (см. рис. 11.1, *слева*) и после транслокации — *посттранслокационное* состояние (см. рис. 11.1, *справа*). В изображенном на рисунке претранслокационном состоянии, достигаемом в результате реакции транспептидации в ПТЦ рибосомы, пептидил-тРНК с добавленным новым аминокислотным остатком находится в *A*-участке рибосомы, тогда как деацилированная тРНК находится в *P*-участке. Транслокацией называется внутририбосомное передвижение молекул тРНК, связанных с рибосомой, сопровождающееся сдвигом мРНК относительно рибосомы. Иными словами, пептидил-тРНК переносится из *A*-участка в *P*-участок, деацилированная тРНК освобождает *P*-участок, *A*-участок с новым кодоном мРНК становится свободным. Вместе с передвижением пептидил-тРНК из *A*-участка в *P*-участок перемещается мРНК на один кодон. Завершающая стадия транслокации — спонтанная диссоциация деацилированной тРНК, не занимающей теперь ни *A*-участка, ни *P*-участка и стоящей на «выходе» из рибосомы (положение «*exit*», *E/e*).

Установлено, что процесс транслокации состоит из двух последовательных стадий. Сначала происходит смещение 3'-концов обеих тРНК и С-конца растущего пептида на большой субъединице, так что новообразованная пептидная группа и сложэфирная группа пептидил-тРНК перемещаются в пределах пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) из его *a*-участка в *p*-участок, а САА-конец деацилированной тРНК вытесняется из ПТЦ в находящийся вблизи *e*-участок (шаг 1 — см. рис. 11.1, *1*). Затем остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК перемещается на малой субъединице из *A*-участка в *P*-участок, вытесняя оттуда оста-

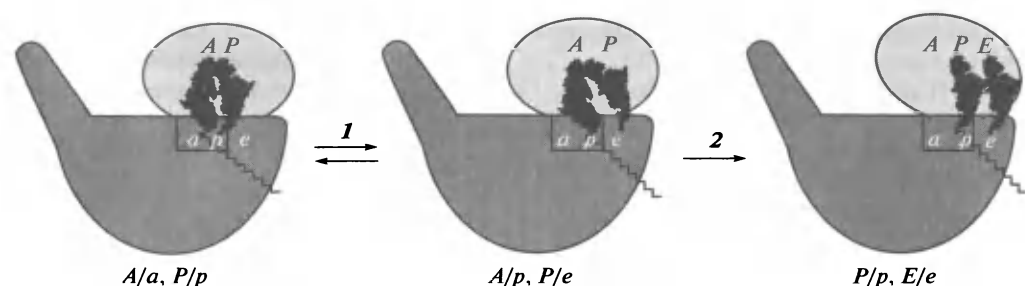


Рис. 11.1. Схема, изображающая два состояния транслирующей рибосомы — претранслокационное (*слева*) и посттранслокационное (*справа*), а также переход между ними — «гибридное» состояние (*в середине*).

1: перемещение 3'-концов в тРНК. *2*: транслокация

деацелированной тРНК (шаг 2 — см. рис. 11.1, 2). За шагом 2 следует выход молекулы деацелированной тРНК из рибосомы (шаг 3).

Существуют пять способов измерения транслокации, которые основаны на следующих свойствах посттранслокационной рибосомы: 1) реакции транспептидации с использованием низкомолекулярного акцепторного субстрата, например пурамицина; 2) изменении внутририбосомного окружения тРНК после ее переноса из *A*- в *P*-участок; 3) связывании аминоксил-тРНК со свободным *A*-участком; 4) освобождении деацелированной тРНК из рибосомы; 5) передвижении мРНК относительно рибосомы.

1. Пурамициновая реакция — наиболее простой и распространенный способ измерения транслокации. Как упоминалось ранее, пурамицин представляет собой низкомолекулярный аналог аминоксил-тРНК (см. рис. 8.6), могущий служить акцепторным субстратом для пептидилтрансферазного центра рибосомы (ПТЦ). Аминогруппа аминоксильного остатка этого соединения атакует сложноэфирную группировку пептидил-тРНК (или ее аналога), что приводит к транспептидации. Образовавшийся пептидилпурамицин освобождается из рибосомы. Пептидил-тРНК реагирует с пурамицином в посттранслокационной, но не в претранслокационной (включая состояние *A/p*, *P/e*) рибосоме. Таким образом, если пептидильный остаток содержит метку, то освобождение метки из рибосомы после добавления пурамицина (компетентность к пурамицину) может быть использовано для количественного измерения посттранслокационного состояния исследуемой популяции рибосом. Наоборот, некомпетентность к пурамицину указывает на то, что частицы находятся в претранслокационном состоянии.

2. Если тРНК, связанная с *A*-участком, содержит флюоресцентную метку, то, регистрируя изменение флюоресценции в процессе транслокации, можно получить информацию об изменении внутририбосомного окружения тРНК после ее переноса из *A*- в *P*-участок.

3. Связывание аминоксил-тРНК также может служить количественной характеристикой транслокации. Для таких экспериментов удобнее всего использовать меченую аминоксил-тРНК. Кодонзависимое связывание метки с транслирующей рибосомой возможно только после транслокации; непосредственно после реакции транспептидации связывания не происходит. Следовательно, неспособность к связыванию аминоксил-тРНК указывает на претранслокационное состояние рибосомы, тогда как компетентность к связыванию свойственна посттранслокационному состоянию.

4. Освобождение деацелированной тРНК из транслирующей рибосомы является следствием транслокации. В опытах *in vitro* деацелированная тРНК после транслокации все еще может быть связана с рибосомой на *E*-участке малой и на *e*-участке большой рибосомных субъединиц. Однако это взаимодействие неустойчиво; при физиологических условиях, особенно при невысоких концентрациях Mg^{2+} , деацелированная тРНК освобождается из транслирующей рибосомы после транслокации. Поэтому после транспептидации деацелированная тРНК остается прочно связанной с рибосомой, и только транслокация позволяет ей освободиться в раствор. Следовательно, для транслирующей рибосомы удержание деацелированной тРНК отражает претранслокационное состояние, а отсутствие (в надлежащих условиях) деацелированной тРНК в рибосоме свидетельствует о посттранслокационном состоянии.

5. Перемещение мРНК как индикатор транслокации — более сложный в техническом отношении подход. Различают два типа экспериментов подобного рода.

Непрямое измерение основано на появлении компетентности к связыванию аминокислотами-аминоацил-тРНК, специфической к кодону, следующему за установленным в А-участке рибосомы. Прямое измерение требует анализа изменения закрытого (защищаемого) рибосомой участка матрицы. В прямом тесте было показано, что сдвиг полинуклеотидной матрицы на один триплет относительно рибосомы сопровождается появлением компетентности к пуromицину и связыванию аминокислотами-аминоацил-тРНК.

11.2. Участие фактора элонгации (EF-G или eEF2) в транслокации

11.2.1. Структура белка EF2

Транслокация катализируется довольно крупным белком, называемым фактором элонгации G (EF-G) у прокариот и фактором элонгации 2 (eEF-2) у эукариот. Молекулярная масса этого белка у бактерий составляет около 80 000; он представляет собой одну полипептидную цепь длиной 701 (у *Escherichia coli*) или 691 (у *Thermus thermophilus*) аминокислотный остаток, образующую пять глобулярных доменов. Эукариотический фактор элонгации несколько крупнее; его молекулярный вес у животных составляет около 95 000.

Известна полная третичная структура белка EF-G *Thermus thermophilus* (рис. 11.2 и рис. 11.1 вкл.). Из пяти составляющих его доменов четыре (I, II, III и V) тесно сгруппированы вместе, тогда как домен IV имеет удлиненную форму и выступает из указанной группы, что делает всю молекулу вытянутой и похожей на головастика. Размеры белка составляют $120 \times 60 \times 50 \text{ \AA}$. N-концевые домены I (G-домен) и II очень похожи на гомологичные домены I и II белка EF-Tu (см. рис. 9.4), за исключением дополнительного крупного субдомена G' в C-концевой части G-домена. Последовательность элементов вторичной структуры белка EF-G такова: $\beta\alpha[\beta \leftrightarrow \alpha]\beta\beta\alpha\beta\alpha[\beta\beta\beta\beta\alpha\alpha]\beta\alpha$. (В квадратные скобки заключены «эффекторная петля» $\beta \leftrightarrow \alpha$ и G'-субдомен.) Так же как и в EF-Tu, «эффекторная петля» между α -спиралью A и β -тяжом 2 G-домена является гибкой и,

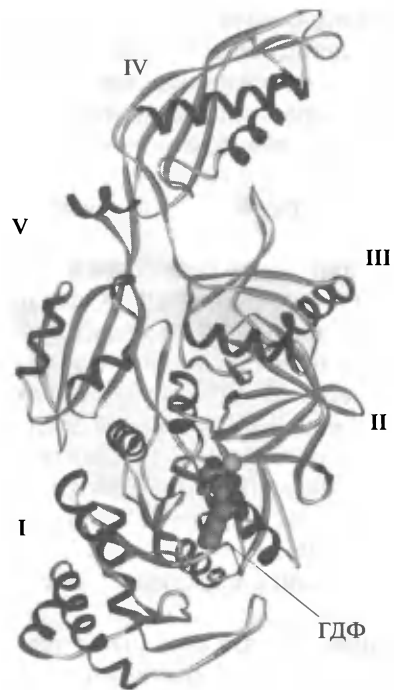


Рис. 11.2. Полная третичная и вторичная структуры фактора элонгации EF-G из *Thermus thermophilus* по данным рентгеноструктурного анализа (представлена в формате «cartoon»).

Пять глобулярных доменов фактора обозначены римскими цифрами, начиная от N-концевого домена I, или G-домена, и кончая C-концевым доменом V. PDB ID 1FNM. Laurberg et al. (2000) *J. Mol. Biol.* **303**: 593–603. (Ранее структура EF-G из *Thermus thermophilus* была расшифрована одновременно и независимо двумя группами исследователей: американской — Czworkowski et al. (1994) *EMBO J.* **13**: 3661–3668 — и шведско-российской — Aevarsson et al. (1994) *EMBO J.* **13**: 3669–3677, но структура домена III была неполной.)

по-видимому, способен находиться в различных конформациях в зависимости от функционального состояния белка.

Несмотря на значительное различие в аминокислотной последовательности, домен II белка EF-G очень хорошо накладывается на домен II белка EF-Tu. Он также представляет собой бочкообразную структуру, формируемую антипараллельными β -тяжами (« β -бочку»); отличие от гомологичного домена белка EF-Tu заключается в присутствии в EF-G N-концевой β -шпильки, не входящей в состав «бочки». Домен V белка EF-G пространственно примыкает к G-домену и занимает позицию, соответствующую таковой домена III белка EF-Tu по отношению к доменам I и II. Однако структурной гомологии между доменом V белка EF-G и доменом III белка EF-Tu не выявляется. В отличие от β -структурной укладки домена III белка EF-Tu, домен V белка EF-G имеет двуслойную структуру $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ и похож на рибосомный белок S6 (см. рис. 7.4). Функции группы доменов I, II и V белка EF-G эквивалентны функциям соответствующих доменов белка EF-Tu, таким как связывание и расщепление ГТФ (домен I, или G), конформационные изменения, влияющие на сродство к рибосоме, взаимодействие с факторсвязывающим участком большой рибосомной субъединицы.

Домены III и IV белка EF-G не имеют аналогии с доменами EF-Tu и могут рассматриваться как специфические участки молекулы, необходимые для обеспечения функции транслокации. Домен III имеет двуслойную $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ структуру, близкую к таковой у домена V (и рибосомного белка S6). Домен IV формирует выступающий «хвост головастика»; топология элементов его вторичной структуры весьма необычна. Полная последовательность этих элементов такова:

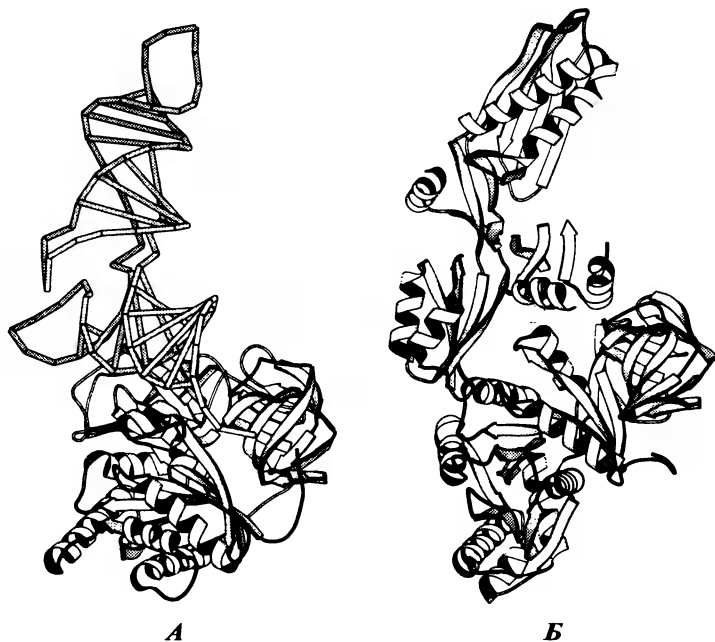


Рис. 11.3. Сравнение структур тройственного комплекса Aa-tRNA•EF-Tu•GMP-PCP (А) и комплекса EF-G•GDP (Б): «молекулярная мимикрия».

В структуре EF-G домен III был разрешен не полностью.

Воспроизведено из Nissen et al. (1995) *Science* 270: 1464—1472, с разрешения авторов и издательства

ββββαβββαβ, с дополнительными С-концевыми β-тяжём и α-спиралью, идущими от домена V. Специфичность укладки заключается в том, что основной β-слой составлен из параллельных, а не антипараллельных тяжей, и параллельные тяжи 4 и 7 соединены нетипичным левозакрученным образом (через спираль A и короткие тяжи 5 и 6).

Самое замечательное состоит в том, что пара «домен III/домен IV» белка EF-G по своему размеру, форме и ориентации доменов имитирует структуру и ориентацию L-образной молекулы аминоксил-тРНК, когда она сидит на белке EF-Tu (рис. 11.3): домены III и IV являются аналогами антикодон-дигидроуридилового стебля и акцептор-тимидил-псевдоуридилового стебля тРНК соответственно («молекулярная мимикрия»). Таким образом, в целом общий вид и даже некоторые детали структуры белка EF-G и структуры комплекса Aa-tRNA•EF-Tu•ГТФ очень похожи.

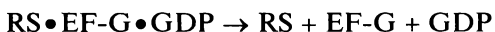
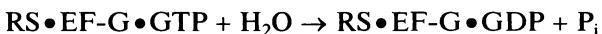
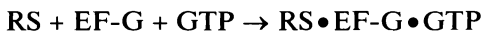
11.2.2. Взаимодействия EF2

EF2 (бактериальный EF-G или эукариотический eEF-2) взаимодействует с ГТФ и рибосомой. Это взаимодействие индуцирует ГТФазную активность, и ГТФ расщепляется до ГДФ и ортофосфата. При взаимодействии (комплексообразовании) EF-G и ГТФ с претранслокационной рибосомой происходит быстрая транслокация, а EF-G, ГДФ и ортофосфат освобождаются из комплекса с рибосомой.

ГТФ взаимодействует с доменом I (G-доменом) белка EF-G. Этот же домен катализирует гидролиз ГТФ. Структура ГТФ/ГДФ-связывающего участка и ГТФазного центра белка EF2 (EF-G или eEF-2) очень близка к таковой в белке EF1 (EF-Tu, см. подразд. 11.2.1). Однако взаимодействие свободного EF-G (или eEF-2) с ГТФ значительно слабее, чем аналогичное взаимодействие EF-Tu (или eEF-1) с ГТФ, и комплекс EF-G•GTP нестабилен. Сильное взаимодействие EF-G с ГТФ возникает лишь при присоединении EF-G к рибосоме. ГТФ индуцирует в белке EF-G конформационные изменения, которые приводят к появлению сильного сродства фактора к рибосоме. В этом отношении ГТФ очень специфичен; вместо него не могут быть использованы ни другие нуклеозидтрифосфаты, ни какие бы то ни было нуклеозидмоно- и дифосфаты. Однако ГТФ может быть заменен его нерасщепляемыми аналогами — гуанилилметилendifосфонатом (GMP-PCP) или гуанилимидодифосфатом (GMP-PNP) (см. рис. 8.8).

Комплекс EF-G•GTP (eEF2•GTP) может возникать при связывании как с функциональной (транслирующей), так и с вакантной рибосомой и даже с изолированной большой рибосомной субъединицей. Участок связывания EF-G на 50S субъединице находится у основания L7/L12-стержня (см. подразд. 8.4); в целой (70S или 80S) рибосоме он расположен на границе рибосомных субъединиц, в районе, примыкающем к тРНК-связывающему A-участку на 30S субъединице. Связыванию EF-G•GTP препятствует находящаяся в A-участке рибосомы аминоксил-тРНК, а также другой белковый фактор — EF1 (EF-Tu или eEF1). В любом случае связывание EF-G•GTP (или eEF2•GTP) с рибосомой или с 50S (60S) рибосомной субъединицей приводит к расщеплению (гидролизу) ГТФ. ГТФазный центр находится на самом EF-G, но не активен в отсутствии рибосомы. Если рибосома вакантна (или если используется большая рибосомная субъединица), то происходит просто гидролиз ГТФ, не сопряженный с какими-либо событиями элонгации.

Гидролиз ГТФ катализируемый белком EF-G на рибосоме, приводит к тому, что белок теперь оказывается в комплексе с ГДФ и утрачивает сродство к рибосоме, и EF-G и ГДФ освобождаются из рибосомы. Таким образом, последовательность реакций с участием белка EF-G такова:



Если в реакциях участвует вакантная рибосома или 50S рибосомная субъединица, то весь процесс представляет собой не более чем непродуктивный гидролиз ГТФ ($GTP + H_2O \rightarrow GDP + P_i$), катализируемый рибосомосвязанным белком EF-G. Другими словами, в этом случае EF-G в комбинации с рибосомой выступает как простая ГТФаза. Однако когда в процесс связывания EF-G (eEF2) и индуцированный гидролиз ГТФ вовлечена претранслокационная рибосома, то гидролиз ГТФ оказывается сопряжен с транслокацией.

Возникает вопрос: с какой из перечисленных выше последовательных реакций с участием EF-G непосредственно сопряжена транслокация? Долгое время предполагалось, что транслокация — это энергопотребляющий процесс и что она прямо сопряжена с гидролизом ГТФ на рибосоме. Оба эти предположения оказались неверными. Во-первых, было показано, что транслокация в принципе является термодинамически спонтанным процессом, сопровождающимся освобождением свободной энергии (см. подразд. 11.3 и 11.5.2). Более того, гипотеза о сопряжении транслокации с гидролизом ГТФ была опровергнута прямыми экспериментами, в которых вместо ГТФ использовался его нерасщепляемый аналог: транслокация наблюдалась, когда претранслокационные рибосомы взаимодействовали с EF-G и GMP-PCP или GMP-PNP, а затем фактор отмывался раствором, т. е. без гидролиза ГТФ (Спирин и др., 1975, 1976). Отсюда следует вывод, что для обеспечения (катализа) транслокации достаточно присоединения EF-G•GTP (или EF-G•GMP-PCP, или EF-G•GMP-PNP) к рибосоме, а затем его отсоединения. Здесь возможны два объяснения: само присоединение (сродство) белка к рибосоме производит некое силовое воздействие, передвигающее молекулы тРНК в рибосоме, или в претранслокационной рибосоме с присоединенным к ней EF-G кинетический барьер для спонтанных транслокационных перемещений становится пониженным.

11.2.3. Транслокационные интермедиаы

Следуя идеологии переходных состояний при ковалентном и нековалентном катализе (см. подразд. 9.2.3), можно предположить, что формирующийся на рибосоме комплекс EF2•GTP как катализатор имеет специфическое сродство к некоему переходному состоянию реакции транслокации. Двустадийность процесса транслокации, с промежуточным «гибридным» состоянием рибосомы A/p, P/e (см. рис. 11.1; Моazed и Ноллер, 1989), установлена экспериментально, и это состояние могло бы быть *переходным состоянием (transition state)*, имеющим сродство к катализатору. Вместе с тем, рассуждая о молекулярных аспектах переходного состояния, необходимо принимать во внимание сходство между доменом

IV белка EF-G и антикодонным стеблем тРНК в тройственном комплексе EF-Tu•Aa-tRNA•GTP (так называемая «молекулярная мимикрия», см. рис. 11.3). Это сходство наводит на мысль, что домен IV может имитировать антикодонную ветвь тРНК и взаимодействовать с A-участком 30S рибосомной субъединицы, когда EF-G связывается с рибосомой. В таком случае в результате взаимодействия EF-G•GTP (точнее, доменов I, II и V белка EF-G, составляющих EF-Tu-подобную структуру) с фактосвязывающим участком на большой субъединице претранслокационной рибосомы остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК может вытесняться из A-участка, и вместо него в A-участок будет входить «хвост головастика» — домен IV. Существуют экспериментальные указания на то, что домен IV связанного с рибосомой белка EF-G действительно находится вблизи декодирующего центра на 30S субъединице (см. подразд. 8.4). В таком случае пептидил-тРНК будет занимать переходную позицию, оставаясь не перенесенной полностью в P-участок. Это обстоятельство наводит на мысль, что при связывании EF-G с претранслокационной рибосомой дело не исчерпывается переводом ее в более или менее стабильное «гибридное» состояние A/p , P/e , а должен происходить еще и короткоживущий конформационный сдвиг, когда остатки тРНК вытесняются из их A- и P-участков. Конформационные изменения, индуцируемые белком EF-G в претранслокационном рибосомном комплексе, включают, очевидно, изменения в самой рибосоме, происходящие прежде всего на границе двух рибосомных субъединиц (см. гл. 18).

Во всяком случае можно ожидать, что реакция транслокации осуществляется через ряд последовательных фаз. Начальная фаза — связывание EF2 и ГТФ с рибосомой, приводящее к «выбору» из двух равновесных посттранспептидационных состояний — A/a , P/p и A/p , P/e (см. рис. 10.5) — состояния A/p , P/e , и к фиксации рибосомы в этом «гибридном» состоянии, т.е. фактически к переходу из претранслокационного в промежуточное «гибридное» состояние со связанным EF2. Действительно, было прямо показано, что EF2 (EF-G) с нерасщепляемым аналогом ГТФ (GMP-PNP) стабилизирует «гибридное» состояние A/p , P/e (Шпигель, Ермоленко и Ноллер, 2007). За этим должна следовать перестройка рибосомного комплекса — трансформация в переходное состояние (*transition state*), по-видимому, сопровождающаяся вытеснением остатка тРНК из A-участка малой рибосомной субъединицы при участии домена IV связанного EF-G. Можно предположить, что гипотетическое переходное состояние рибосомы достигается сопряженно с переходным состоянием EF2 (EF-G) в ходе каталитического расщепления ГТФ. Завершение гидролиза ГТФ на EF2 (EF-G) сопровождается выходом рибосомы из переходного состояния и установлением посттранслокационного состояния. Освобождение EF2 и ГДФ из рибосомы завершает стадию транслокации элонгационного цикла.

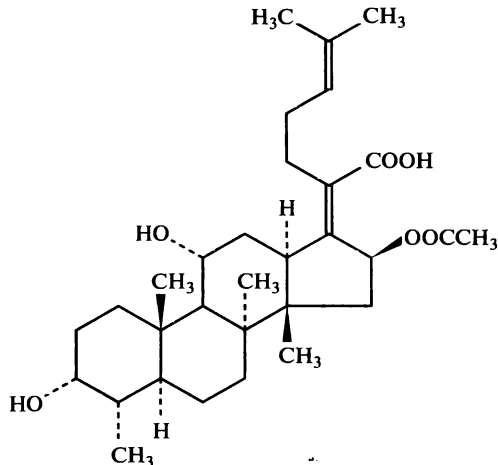
Как упоминалось ранее, механическое удаление связанного EF-G (EF-G•GMP-PCP или EF-G•GMP-PNP) из рибосомного комплекса (например, его полная отмывка в условиях *in vitro*) тоже приводит к переходу в посттранслокационное состояние. Очевидно, «гибридный» интермедиат A/p , P/e в отсутствие белка EF-G нестабилен, а условия отмывки белка из рибосомы создают предпосылки для его преимущественного превращения в посттранслокационный комплекс одновременно с удалением белка. Промежуточное состояние транслокации, формирующееся в присутствии EF-G•GMP-PCP или EF-G•GMP-PNP, может, хотя и медленно, также спонтанно превращаться в посттранслокационное, приводя к образованию посттранслокационного рибосомного комплекса. Естественный и

самый быстрый способ перехода от промежуточного к посттранслокационному состоянию — это гидролиз ГТФ, связанного с EF-G, ведущий к конформационным изменениям в белке и его освобождению из рибосомы.

11.2.4. Роль ГТФ и его гидролиза в катализе транслокации

В соответствии с последовательностью реакций, приведенной ранее (см. подразд. 11.2.2), можно рассматривать три аспекта вклада ГТФ и его гидролиза в транслокацию. Во-первых, ГТФ служит *эффектором*, который обеспечивает должную конформацию белка EF-G, имеющую сродство к рибосоме в промежуточном состоянии транслокации (транслокационном интермедиате) и таким образом выводящую рибосому из претранслокационного состояния. ГТФ может быть заменен на один из его негидролизуемых аналогов (GMP-PCP или GMP-PNP), каждый из которых также способен выполнять эту функцию эффектора. Во-вторых, ГТФ является *расщепляемым* эффектором. Он гидролизуется на белке EF-G, связанном с рибосомой. Таким образом, эффектор оказывается разрушен, в результате чего EF-G принимает конформацию, которая позволяет ему уйти из рибосомы и предоставляет возможность рибосомному промежуточному состоянию — транслокационному интермедиату — перейти в посттранслокационное состояние с пептидил-тРНК в *P*-участке. Следовательно, гидролиз ГТФ необходим для выхода из переходного конформационного состояния. Эта реакция играет ту же роль, что и разрушение промежуточного продукта (распад интермедиата) до конечных продуктов реакции в случае ковалентного ферментативного катализа. Другими словами, расщепление (гидролиз) ГТФ играет энергетическую роль, аналогичную роли самой катализируемой ковалентной реакции при ферментативном катализе.

Существует также и третий аспект рассматриваемой проблемы. Диссоциация EF-G из посттранслокационного комплекса вызывается гидролизом ГТФ, так как комплекс EF-G•GDP обладает слабым сродством к рибосоме. Использование нерасщепляемых аналогов ГТФ показало, что транслокация может катализироваться EF-G•GMP-PCP или EF-G•GMP-PNP, хотя и медленнее, чем в случае использования EF-G•GTP, но в этом случае EF-G остается ассоциированным с рибосомой и после транслокации. Возможно, транслокационный интермедиат, закрепленный активной конформацией EF-G, способен спонтанно превращаться в посттранслокационную рибосому, но с еще связанным белком EF-G. Этот вывод следует из факта, что эффектор, индуцирующий сродство EF-G к рибосоме, все еще не разрушен, и белок продолжает удерживаться в посттранслокационном комплексе. Однако присутствие EF-G на рибосоме блокирует переход к следующему этапу элонгационного цикла: связывание тройственного комплекса EF-Tu•Aa-tRNA•GTP невозможно из-за того, что факторсвязывающий участок 50S субъединицы занят. Поэтому в результате транслокации, произведенной EF-G с нерасщепляемым аналогом ГТФ, пептидил-тРНК приобретает способность реагировать с акцепторным субстратом (специфичность к пуromицину). Вместе с тем такая посттранслокационная рибосома не может связать очередную аминоксил-тРНК и, следовательно, неспособна к продолжению элонгационного цикла. В экспериментах *in vitro* EF-G с нерасщепляемым аналогом ГТФ отмывался от таких посттранслокационных рибосом, которые в результате этого приобрели способность связывать аминоксил-тРНК



и продолжать элонгацию. Это означает, что в нормальных условиях EF-G должен присоединиться к рибосоме, чтобы вызвать транслокацию, а затем покинуть ее, чтобы разрешить следующий шаг.

В свете вышесказанного интересен антибиотик фусидовая кислота (рис. 11.4), специфически воздействующий на EF-G. EF-G в комплексе с фусидовой кислотой способен нормально взаимодействовать с ГТФ и затем с рибосомой; это взаимодействие приводит к гидролизу ГТФ до ГДФ и ортофосфата. Таким образом, осуществляется нормальная транслокация. Однако фусидовая кислота повышает сродство EF-G к рибосоме, так что после распада ГТФ комплекс EF-G • GDP не освобождается. Как следствие, хотя транслокация произошла, очередная аминоацил-тРНК не может связаться с А-участком рибосомы, и элонгация останавливается.

11.2.5. Факторзависимый элонгационный цикл

Итак, вслед за кодонзависимым связыванием аминоацил-тРНК, катализируемым белком EF1 (EF-Tu или eEF1) с ГТФ, и транспептидацией, катализируемой самой рибосомой, происходит транслокация, катализируемая белком EF2 (EF-G или eEF2). В целом эти три последовательные стадии образуют факторзависимый элонгационный цикл, схематически представленный на рис. 11.5. По сравнению с упрощенной схемой элонгационного цикла на рис. 8.3 он включает в себя промежуточные состояния рибосомного комплекса (транслирующей рибосомы), когда вышеуказанные белки в комплексе с ГТФ временно находятся на рибосоме и создают условия для быстрого преодоления кинетического барьера данной стадии цикла — связывания аминоацил-тРНК или транслокации.

11.3. Бесфакторная («неэнзиматическая») транслокация

Было установлено, что в бесклеточных системах трансляции транслокация может происходить и в отсутствие факторов элонгации и ГТФ (Пестка, 1969; Гаврилова, Спириин и др., 1976). Такая «неэнзиматическая» транслокация проис-

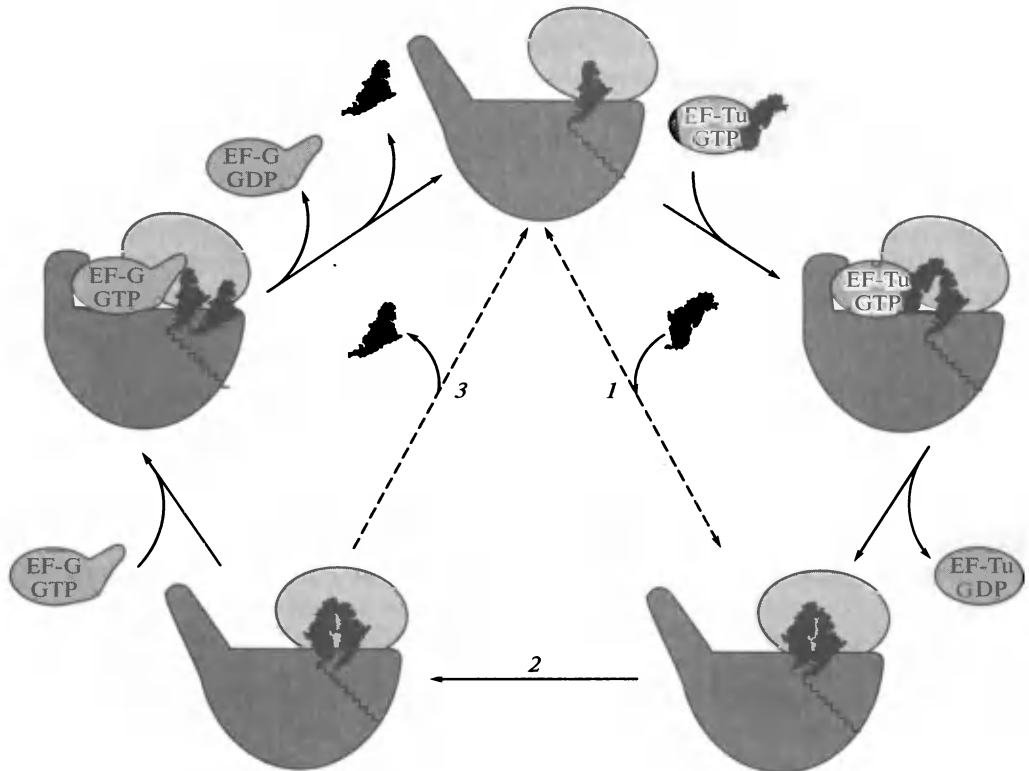


Рис. 11.5. Факторзависимый элонгационный цикл транслирующей рибосомы.

Пунктирными стрелками показаны возможности бесфакторного («неэнзиматического») связывания аминокил-тРНК с *A*-участком рибосомы и бесфакторной («неэнзиматической») транслокации пептидил-тРНК из *A*-участка в *P*-участок, что создает возможность шунтированного (бесфакторного) элонгационного цикла. Пояснения см. в тексте

ходит гораздо медленнее, чем катализируемая комплексом EF-G•GTP, однако рибосома переходит в нормальное посттранслокационное состояние и способна продолжать элонгацию. Отсюда можно заключить, что транслокация является термодинамически спонтанным процессом. Транслокационный механизм оказывается принципиально присущим самой рибосоме, а не привносится фактором элонгации. В данном случае ситуация снова оказывается очень похожей на таковую со связыванием аминокил-тРНК: оба процесса могут идти медленно в бесфакторном режиме (см. подразд. 9.2.2) и обеспечиваются только самой рибосомой. Следовательно, факторы элонгации лишь катализируют термодинамически разрешенные и механически обеспеченные процессы.

Бесфакторную («неэнзиматическую») транслокацию можно значительно ускорить некоторыми модификациями рибосомы. Так, было показано, что обработка бактериальных рибосом или предварительная обработка только их 30S субъединиц некоторыми реагентами, блокирующими тиоловые группы — например, парахлормеркурибензоатом, — приводит к многократной стимуляции бесфакторной транслокации (Гаврилова и Спириин, 1971, 1972). Этот факт снова подтверждает термодинамическую спонтанность транслокации и независимость направления соответствующей конформационной перестройки рибосомы от до-

полительных источников энергии. Мишенью действия парахлормеркурибензоата, ответственной за эффект, оказался рибосомный белок S12, блокада SH-групп которого и вызывает снижение транслокационного кинетического барьера (Спирин и др., 1974). Такое же действие оказывает избирательное удаление белка S12 из малой субъединицы рибосомы. Антибиотик спарсомидин, связывающийся с большой субъединицей рибосомы — с ее ПТЦ (см. подразд. 10.6.7) — и являющийся сильным ингибитором пептидилтрансферазной реакции, тоже оказался индуктором бесфакторной («неэнзиматической») транслокации, причем почти столь же эффективным, что и EF-G и ГТФ (Фредрик и Ноллер, 2003). Наконец при низких концентрациях Mg^{2+} бесфакторная транслокация может быть ускорена и без применения каких-либо специальных модификаторов или стимуляторов (см. далее).

Бесфакторная («неэнзиматическая») транслокация при реализуемой возможности бесфакторного («неэнзиматического») связывания аминоксил-тРНК и транспептидации, катализируемой рибосомой, может замкнуть полный *бесфакторный элонгационный цикл*. Он показан пунктирными шунтирующими стрелками на рис. 11.5. Повторение циклов дает в результате медленную *бесфакторную элонгацию* (Гаврилова, Спирин и др., 1976). В бесклеточных бактериальных системах была проведена бесфакторная трансляция полиуридилевой кислоты и ряда синтетических гетерополинуклеотидов и показано полное кодовое соответствие полипептидного продукта матричному полинуклеотиду.

В то время как повышение концентрации Mg^{2+} стимулирует связывание аминоксил-тРНК, понижение концентрации этих ионов стимулирует транслокацию (Белицина и Спирин, 1979). При концентрации Mg^{2+} около 3 мМ скорость бесфакторной транслокации в бактериальных рибосомах может приближаться к таковой в присутствии EF-G•GTP, но зато связывания аминоксил-тРНК практически не происходит. Наоборот, при концентрации Mg^{2+} около 30 мМ транслокации практически не происходит, но бесфакторное связывание аминоксил-тРНК идет эффективно. Попеременно меняя концентрацию ионов Mg^{2+} , можно имитировать действие факторов элонгации и тем самым значительно ускорить бесфакторный элонгационный цикл. Переменная концентрация Mg^{2+} может рассматриваться как способ энергообеспечения для ускорения бесфакторного элонгационного цикла.

При сравнении бесфакторной транслокации с EF-G•GTP-катализируемой транслокацией был сделан вывод, что фактор не снижает тепловую энергию активации процесса, указывая на то, что в данном случае катализ имеет преимущественно энтропийную природу (см. обзор: Spirin A. S., 1978). Ингибиторный анализ также показал, что фактор не создает нового реакционного пути: специфические ингибиторы транслокации (см. далее) действуют как на энзиматический, так и на неэнзиматический процессы, указывая на существование одинакового транслокационного механизма с одними и теми же мишенями в обоих случаях. Таким образом, существование бесфакторной («неэнзиматической») транслокации показывает, что механизм транслокации присущ самой рибосоме и обеспечивается энергией без участия ГТФ.

Как отмечалось в подразд. 11.1 (см. рис. 11.1), процесс транслокации состоит из двух последовательных стадий: 1) локального перемещения 3'-конца остатка тРНК молекулы пептидил-тРНК с ее сложноэфирной и С-концевой пептидной группами из *a*-участка ПТЦ в *p*-участок при одновременном вытеснении ССА-конца деацилированной тРНК из *p*-участка в *e*-участок; 2) крупномасштаб-

ного перемещения самого остатка тРНК молекулы пептидил-тРНК из *A*-участка и основной части молекулы деацилированной тРНК из *P*-участка рибосомы (ее малой субъединицы) в *P*- и *E*-участки соответственно вместе с передвижением матричного полинуклеотида на один триплет. Эти две стадии наблюдаются как в случае нормальной EF-G • GTP-катализируемой транслокации, так и в процессе бесфакторной («неэнзиматической») транслокации. Первая стадия — локальное смещение концов тРНК — особенно легко происходит в бесфакторном режиме. Действительно, после транспептидации гибкий ССА-«хвост» молекулы тРНК, сидящей в *P*-участке, утратив сложноэфирную и примыкающую пептидную группы, теряет сродство к *p*-участку ПТЦ, приобретая свободу перемещения, в результате чего концевой аденозин может спонтанно сдвигаться и закрепляться в *e*-участке большой субъединицы за пределами ПТЦ еще до транслокационного сдвига всей молекулы в *E*-участок. С другой стороны, в результате транспептидации на аминоксил-тРНК, сидящую в *A*-участке, навешивается С-конец растущего пептида с образованием новой пептидной группы, что приводит к появлению сродства ССА-«хвоста» этой тРНК с прилегающей сложноэфирной группой к освобождающемуся *p*-участку ПТЦ. Поэтому процесс транслокации — прохождение его первой стадии — может начинаться спонтанно, до связывания фактора элонгации EF1 (EF-G), сразу по завершении транспептидации. Ввиду термодинамической нестабильности положения концов обеих тРНК в ПТЦ после распада тетраэдрического интермедиата они в определенных условиях (например, при недостаточно высоком уровне Mg^{+2} в среде или при определенных манипуляциях с претранслокационными рибосомами *in vitro*) могут легко перемещаться — сложноэфирная группа пептидил-тРНК — в *p*-участок ПТЦ, а конец деацилированной тРНК — в *e*-участок за пределами ПТЦ, без изменения положений основной части тРНК в *A*- и *P*-участках соответственно (см. рис. 11.1). В таком «гибридном» состоянии *A/p*, *P/e* рибосома в отсутствие фактора элонгации EF1 (EF-G) может быть довольно стабильна при умеренной концентрации Mg^{+2} .

Вторая стадия транслокации — передвижение относительно больших молекулярных масс тРНК в рибосоме — в отсутствие EF-G с ГТФ протекает гораздо медленнее и требует либо значительно большего времени, либо специальной стимуляции, такой как существенное понижение концентрации Mg^{+2} в среде или модификация парахлормеркурибензоатом (см. ранее).

11.4. Передвижения матрицы при транслокации

11.4.1. Триплетная транслокация

Как было отмечено ранее, транслокация сопровождается перемещением матричного полинуклеотида на один кодон в направлении от 5'- к 3'-концу. В процессе этого сдвига и после него связь между антикодоном пептидил-тРНК и кодоном матрицы сохраняется, т.е. кодон-антикодовый дуплекс движется как единое целое из *A*-участка в *P*-участок рибосомы. Естественно задать вопрос: что служит ведущим актом транслокации — перемещение матрицы или перемещение пептидил-тРНК? Целый ряд фактов указывает на то, что главную роль играет перемещение тРНК, которая своим антикодоном тянет за собой кодон матрицы. Демонстрацией независимости транслокации от матричного полинуклеотида ста-

ли эксперименты, в которых был описан рибосомный синтез полипептида из аминоксил-тРНК в отсутствие матричного полинуклеотида (безматричная элонгация; Спирин и др., 1981); в этом случае было показано прохождение нормального элонгационного цикла с транслокацией, катализируемой EF-G•GTP. Наиболее прямым указанием на ведущую роль тРНК и пассивную роль мРНК в процессе транслокации был эксперимент, в котором мутантная тРНК, имевшая в качестве антикодона нуклеотидный квадруплет вместо триплета, супрессировала мутации со сдвигом рамки (+1) (Ридл и Карбон, 1973); другими словами, такая тРНК передвигала мРНК в рибосоме на четыре (но не на три) нуклеотидных остатка. Таким образом, главным событием транслокации, очевидно, является перемещение пептидил-тРНК из *A*-участка в *P*-участок рибосомы: антикодон тРНК тащит с собой связанный с ним кодон матрицы, приводя к соответствующему перемещению матричного полинуклеотида относительно рибосомы на один кодон (в норме). В результате этих измерений в *A*-участке устанавливается следующий (по направлению к 3'-концу) нуклеотидный триплет матрицы, тогда как предыдущий (примыкающий с 5'-конца) триплет вместе с антикодоном деацелированной тРНК оказывается выведенным из *P*-участка.

В то же время нельзя исключать существование дополнительного механизма активного движения рибосомы вдоль цепи мРНК в направлении от 5'- к 3'-концу. Это предположение основывается прежде всего на способности рибосом расплетать вторичную структуру мРНК «впереди себя» при трансляции, а также на случаях «прыжков» транслирующих рибосом вдоль мРНК, и всегда в направлении 5' → 3', в условиях, когда кодон-антикодоновые взаимодействия слабы или вообще разрушены (см. подразд. 11.4.3). Высказывались даже идеи о присущей рибосоме способности «читать» нуклеотиды или сдвигать цепочку мРНК предпочтительно по триплетам (см., например, Трифионов, 1987).

11.4.2. Нетриплетная транслокация (транслокационные ошибки)

Сдвиг мРНК относительно рибосомы ровно на три нуклеотида в процессе транслокации является абсолютно необходимым условием сохранения рамки считывания в ходе трансляции. Однако возможны ошибки, т. е. нетриплетная транслокация, вследствие которой происходит *сдвиг рамки*. После сдвига рамки внутри данной цепочки мРНК дальнейшее корректное считывание кодонов невозможно. Образующаяся в результате такой трансляции полипептидная цепочка не имеет ничего общего с закодированным белком, и синтез скоро прекращается из-за высокой вероятности встречи стоп-кодона вне корректной рамки считывания. Таким образом, ошибки при транслокации имеют более серьезные последствия, чем ложное кодирование при связывании аминоксил-тРНК.

Вообще, в процессе транслокации цепь мРНК может иногда сдвигаться на число нуклеотидов, меньшее или большее трех, и такой сдвиг сопровождается нормальным переносом пептидил-тРНК из *A*-участка в *P*-участок рибосомы (см. обзоры: Weiss, R., et al., 1990; Atkins, J., and Gesteland, R., 1995). Наиболее часто ошибки транслокации возникают в результате транслокационного перемещения мРНК на два (сдвиг рамки -1) или четыре (сдвиг рамки +1) нуклеотида вместо трех. Средняя вероятность таких ошибок у бактерий составляет от $5 \cdot 10^{-4}$ до 10^{-5} на один кодон мРНК. В основном подобные ошибки происходят на определенных кодонах (так называемые «скользкие» кодоны), и в процесс могут быть во-

влечены определенные тРНК («скользящие» тРНК). Также решающую роль в индуцировании сдвига рамки и выборе направления сдвига может играть контекст.

11.4.2.1. Сдвиг рамки на стадии связывания аминоксил-тРНК

Известны два различных механизма нетриплетного передвижения мРНК. Первый — это ошибочное спаривание мРНК и антикодона на стадии связывания аминоксил-тРНК, но не ошибки на стадии транслокации элонгационного цикла. Один из вариантов — связывание входящей аминоксил-тРНК в *A*-участке с дуплетом (а не триплетом), примыкающим к кодону в *P* участке. Например, сериновая тРНК₃ *E. coli*, обычно узнающая сериновые кодоны AGC и AGU, может войти в *A*-участок с присутствующим там аланиновым кодоном GCA и образовать дуплекс между GC своего антикодона и GC аланинового кодона. После транспептидации транслокация остатка тРНК из *A*-участка в *P*-участок рибосомы приведет к протаскиванию мРНК, но только на два спаренных нуклеотида. В результате этого произойдет перемещение мРНК на дуплет вместо триплета, что приведет к сдвигу рамки -1 , например GCA GCA AAC \rightarrow GCA GC AAA C... В другом случае происходит так называемое перекрывающееся связывание входящей аминоксил-тРНК, когда ее антикодон взаимодействует с триплетом тРНК, накладываемым на следующий кодон. Та же сериновая тРНК₃ служит примером такого поведения: если в *A*-участке присутствует лизиновый кодон AAG, а за ним следует лейциновый кодон CUU, сериновая тРНК₃ может связаться с триплетом AGC, перекрывающим лейциновый кодон. Результатом последующей за этим транслокации будет сдвиг рамки $+1$: AAG CUU \rightarrow AAGC UU... Рассматриваемая тРНК (тРНК^{Сер} *E. coli* с антикодоном GCU) является типичным примером «скользящей» тРНК, способной производить как -1 , так и $+1$ сдвиги рамки из-за ошибочного связывания в *A*-участке. Считается, что такое ее поведение обусловлено структурными особенностями, например гибкостью ее антикодона.

Так как в основе обсуждаемого выше механизма лежит неправильное связывание тРНК, сдвиг рамки, происходящий по этому механизму, может быть стимулирован теми же самыми факторами, которые стимулируют ложное кодирование (см. подразд. 9.4.4), включая аминоксидозные антибиотики, повышенную концентрацию Mg²⁺ и полиаминов, нарушенное соотношение различных тРНК, аминокислотное голодание или недостаток определенной тРНК, рибосомная *ram*-мутация и т.д. В частности, вероятность связывания дуплета или перекрывающегося связывания увеличивается, если транслирующая рибосома задерживается на матрице с пустым *A*-участком. Такая ситуация может возникнуть с «голодным» кодоном (в случае голодания по соответствующей аминокислоте) или с редким кодоном, установленном в *A*-участке (особенно если минорная тРНК уже исчерпана, например, в случае tandemных редких кодонов). В отсутствие «своей» аминоксил-тРНК «не своя» скользящая тРНК может войти в *A*-участок и произвести сдвиг рамки.

В некоторых случаях сдвиг рамки в специфическом участке мРНК может быть использован для регуляции синтеза белка. Синтез антизима орнитиндекарбоксилазы (ОДК) млекопитающих регулируется именно таким образом (рис. 11.6). Синтез антизима индуцируется полиаминами; этот белок направляет ОДК, ключевой фермент синтеза полиаминов, на путь протеолитической деградации. Структура

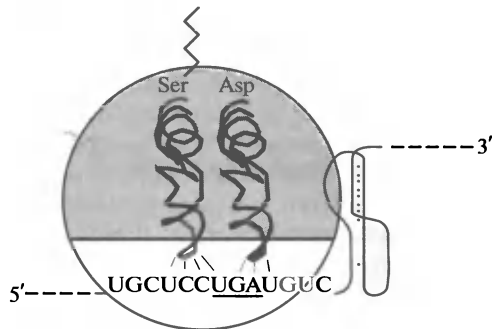


Рис. 11.6. Сдвиг (+1) рамки считывания, индуцируемый полиаминами, при трансляции мРНК, кодирующей антизим орнитин-декарбоксилазы млекопитающих.

Пояснения см. в тексте.

См. Atkins and Gesteland (1996) in *Translational Control* (eds. Hershey et al.), pp. 653–684, CSHL Press, New York

мРНК антизима такова, что первые 35 кодонов находятся в одной рамке с инициаторным кодоном, но за ними расположен стоп-кодон UGA. Сдвиг рамки на стоп-кодоне индуцируется полиаминами. Таким образом, если уровень полиаминов низок, рибосома прочитывает только самое начало последовательности мРНК и терминирует на UGA; следовательно, антизим не синтезируется, а время жизни ОДК сравнительно велико, что обеспечивает синтез полиаминов. Когда полиаминов становится много, вызываемый этим сдвиг рамки +1 позволяет рибосомам продолжать трансляцию в новой рамке считывания и завершить синтез полноразмерного антизима, что вызывает быструю деградацию ОДК. Последовательность мРНК антизима в области сдвига рамки следующая: UCC UGA U. В случае индукции антикодоновая петля сериновой тРНК в А-участке связывает квадруплет UCCU, но не свой кодон UCC; следовательно, последующая транслокация на четыре нуклеотида приводит к установке GAU, кодона аспарагиновой кислоты, в А-участке. Таким образом, изначальная последовательность пептида, заканчивавшаяся на остатке серина, удлиняется дальше остатком аспарагиновой кислоты, и синтез полипептида продолжается до конца. Интересно, что дальше по цепи от области сдвига рамки имеется псевдоузел, который стимулирует этот сдвиг рамки +1 по неизвестному механизму.

11.4.2.2. Сдвиг рамки на стадии транслокации

Второй механизм нетриплетного передвижения мРНК включает в себя собственно транслокационные события: это проскальзывание антикодона относительно мРНК во время транслокации. В обычных случаях связывание кодоном «своей» аминоацил-тРНК происходит в А-участке, но по окончании транспептидации последующая транслокация остатка тРНК из А- в Р-участок может оказаться разобщенной со сдвигом кодона: антикодон тРНК проскальзывает по мРНК или мРНК проскальзывает по антикодону чаще всего на один нуклеотид, что приводит к сдвигу рамки -1 или +1 соответственно. Было показано, что именно в промежуточном состоянии транслокации, когда после транспептидации продукты реакции оказываются сдвинутыми в «гибридные» положения А/р, Р/е (см. рис. 8.15, В и рис. 11.1) или, скорее всего, в последующее (гипотетическое) переходное состояние, кодон-антикодоновые взаимодействия ослабевают, и мРНК может проскальзывать относительно антикодонов в обе стороны — как в 5'-, так и в 3'-направлениях (МакГарри, Фредрик и др., 2005; Шпигель, Ермоленко и Ноллер, 2007). Такое проскальзывание может происходить особенно часто на по-

липидиновых или полипиримидиновых участках мРНК во время транслокации остатков тРНК с соответствующими пиримидиновыми или пуриновыми антикодонами. Простейшие примеры — проскальзывание лизиновой тРНК с антикодоном U*UU по олиго(A)-последовательности или фенилаланиновой тРНК с антикодоном GAA по олиго(U)-последовательности в цепи мРНК; при этом возможны сдвиги рамки как -1, так и +1. Также были обнаружены примеры скольжения лейциновой тРНК с антикодоном GAG на последовательности CUUU (CUUU → CUUU: сдвиг рамки +1), лейциновой тРНК с антикодоном U*AA на последовательности UUUU (UUUU → UUUU: сдвиг рамки -1), фенилаланиновой тРНК с антикодоном GAA на последовательности UUUC (UUUC → UUUC: сдвиг рамки -1), аспарагиновой тРНК с антикодоном QUU на последовательности AAAC (AAAC → AAAC: сдвиг рамки -1), глициновой тРНК на последовательности GGGU (GGGU → GGGU: сдвиг рамки +1), а также некоторые другие.

Эффект проскальзывания может значительно усиливаться в случае, если «скользкие» кодоны расположены в тандеме. Примером может служить последовательность ...U UUU UUA РНК вируса иммунодефицита человека 1 (HIV-1), где сдвиг -1 лейциновой тРНК от UUA к UUU облегчается возможностью предыдущей, фенилаланиновой, тРНК скользить в том же направлении (UUU UUU A...) (подробнее см. ниже, рис. 11.8). Другим примером является последовательность ...A AAA AAC в мРНК вируса опухоли молочной железы мыши: в этом случае аспарагиновая тРНК осуществляет сдвиг рамки -1, по-видимому, одновременно с аналогичным передвижением предыдущей, лизиновой, тРНК (AAA AAA C...). Отсюда можно предположить, что скольжение имеет место на какой-то промежуточной стадии транслокации, когда остатки тРНК в А-участке и тРНК в Р-участке частично выведены из данных участков, но остаются связанными с мРНК. При этом взаимодействия тРНК с мРНК, очевидно, должны быть ослаблены, разрешая тем самым взаимное скольжение.

В последовательностях с высокой частотой сдвигов рамки часто наблюдается присутствие стоп-кодона сразу за «скользким» кодоном. Например, проскальзывание +1 лейциновой тРНК от CUU к UUU (см. ранее) значительно возрастает в последовательности CUU UGA C., что приводит к прочтению последовательности как UUU GAC (Lu-Asp); таким образом, трансляция продолжается в новой рамке считывания вместо остановки на стоп-кодоне. Не совсем понятно, каким образом последующий (в сторону 3'-конца мРНК) кодон может влиять на проскальзывание остатка тРНК в А-участке во время транслокации. Нельзя исключить увеличивающуюся вероятность проскальзывания посттранслокационной рибосомы с пустым А-участком, когда связывание фактора терминации RF после транслокации задерживается.

Проскальзывание тРНК относительно мРНК может быть сильно стимулировано дополнительными элементами в последовательности или в трехмерной структуре мРНК. В ряде случаев такое усиленное проскальзывание в определенном месте используется клеткой или вирусом для получения разных вариантов полипептидов с одной и той же матрицы или для регуляции синтеза полноразмерного полипептида. Характерным случаем такой регуляции является трансляция мРНК одного из трех факторов терминации, RF2, в *Escherichia coli*. Ген и соответственно мРНК, кодирующие этот белок, состоят из двух частей. Первая, меньшая часть последовательности кодирует N-концевой 25-аминокислотный участок белка и заканчивается стоп-кодоном UGA. Оставшийся 339-аминокислотный участок, который расположен в другой рамке считывания, за-

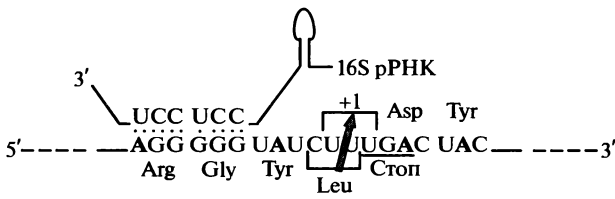


Рис. 11.7. Сдвиг (+1) рамки считывания при трансляции мРНК, кодирующей бактериальный фактор терминации RF2.

Пояснения см. в тексте.

Перерисовано с небольшими модификациями из Weiss and Cherry (1993) in *The RNA World* (eds. Gesteland and Atkins.), pp. 71—89. CSHL Press, New York

кодирован во второй части мРНК. Для считывания второй части последовательности необходим сдвиг рамки +1 в районе указанного стоп-кодона: лейциновая тРНК скользит с CUU на UUU (рис. 11.7). Частота сдвигов рамки в этой последовательности может достигать 30 %, что выражается в синтезе полноразмерной полипептидной цепочки с приемлемым выходом. Как показали эксперименты, для такого высокоэффективного сдвига рамки необходим гексануклеотидный тракт AGGGGG, расположенный в направлении к 5'-концу мРНК от области сдвига рамки. Было продемонстрировано, что комплементарное взаимодействие этой полипуриновой последовательности с 3'-концевым полипиримидиновым участком 16S рРНК в рибосоме (так же как взаимодействие последовательности Шайна—Дальгарно во время инициации трансляции — см. подразд. 14.2.2) важно для усиления проскальзывания рибосомы по квадруплету CUUU, перекрывающемуся со стоп-кодоном. Частота проскальзывания регулируется: если белка RF2 в клетке достаточно, он связывается со стоп-кодоном UGA в А-участке рибосомы и тем самым останавливает трансляцию, так что новых молекул белка RF2 не образуется. Таким образом, эффективное проскальзывание и соответственно синтез белка RF2 происходят только в условиях его нехватки. Это — интересный пример обратной регуляции эффективности трансляции с помощью запрограммированной ошибки транслокации.

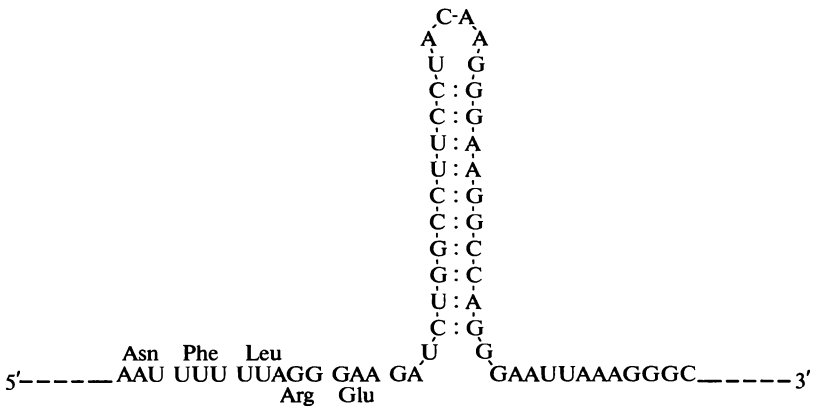


Рис. 11.8. Сдвиг (-1) рамки считывания при трансляции мРНК вируса иммунодефицита человека (HIV-1), кодирующей белки Gag и Pol.

Пояснения см. в тексте.

Адаптировано из Weiss et al. (1989) *New Biologist* 1: 159—169

Программированные сдвиги рамки также используются и в эукариотических системах. Лучше всего изучен случай трансляции ретровирусной мРНК *gag-pol*, например РНК вируса иммунодефицита человека (HIV-1). В результате трансляции этой мРНК могут синтезироваться или белок Gag, или, в гораздо меньшем количестве, объединенный («слитый») белок Gag-Pol, который затем разрезается специальной протеазой на белки Gag и Pol. (Белок Gag затем нарезается на ряд структурных белков, формирующих капсид вирусной частицы, а белок Pol в результате расщепления дает два фермента — вирусную обратную транскриптазу и интегразу.) Дело в том, что последовательности мРНК, кодирующие белки Gag и Pol, находятся в разных рамках считывания, и для синтеза белка Pol необходим сдвиг рамки –1 на границе двух последовательностей. Схема сдвига рамки во время трансляции *gag-pol* мРНК вируса HIV-1 изображена на рис. 11.8. Было замечено, что в таких случаях последовательность, расположенная непосредственно после участка сдвига рамки (т.е. перед двигающейся рибосомой), находится в форме стабильной шпильки или (в некоторых штаммах) формирует структуру псевдоузла, которые, очевидно, создают структурный барьер в процессе транслкации, тем самым способствуя проскальзыванию рибосомы и соответственно сдвигу рамки.

11.4.3. Рибосомные «прыжки»

Другой феномен, который иногда наблюдается при трансляции и также является нарушением принципа триплетной транслкации мРНК, — это так называемые «прыжки» рибосомы: если транслирующая рибосома вынуждена остановиться, дойдя до стоп-кодона или до какого-либо структурного барьера, она может проскочить участок матрицы в направлении к 3'-концу. В отличие от механизма проскальзывания, описанного ранее, рибосомный «прыжок» предполагает полный разрыв кодон-антикодоновых взаимодействий и последующее их восстановление на другом участке мРНК, но всегда ближе к 3'-концу по отношению к месту старта «прыжка». Возобновление этих взаимодействий всегда происходит на кодоне, распознающемся той же тРНК, которая переходит из *A*- в *P*-участок рибосомы. Одним из первых описанных случаев был «прыжок» через стоп-кодон в процессе трансляции мутантной (*amber*-мутация) мРНК β-галактозидазы:

Met Lys Ser Leu Gly Tyr Leu —————> Arg Gly Pro
 AUG AAA AGC UUA GGG UAU CUU UAG CUA CGG GGC CCU...

Частота такого «прыжка» через шесть нуклеотидов (сдвига +6) составляла всего 1%. Подобные «прыжки» на расстояние от двух до девяти нуклеотидов, происходящие с низкой частотой, могут случаться и внутри кодирующих участков самых разных мРНК. Специфические мутации тРНК или рибосомы могут увеличивать частоту «прыжков» вплоть до 20%.

В свое время сообщение о рибосомном «прыжке» через 50 нуклеотидов в процессе трансляции мРНК ДНК-топоизомеразы (транскрипта гена 60 бактериофага T4) стало настоящей сенсацией (Хуанг и др., 1988). В этом случае транслирующая рибосома с пептидил-тРНК^{Gly} совершает «прыжок» с кодона GGA на такой же кодон, отстоящий от первого на 50 нуклеотидов в направлении к 3'-концу мРНК (рис. 11.9). Эффективность этого «прыжка» близка к 100%. Для

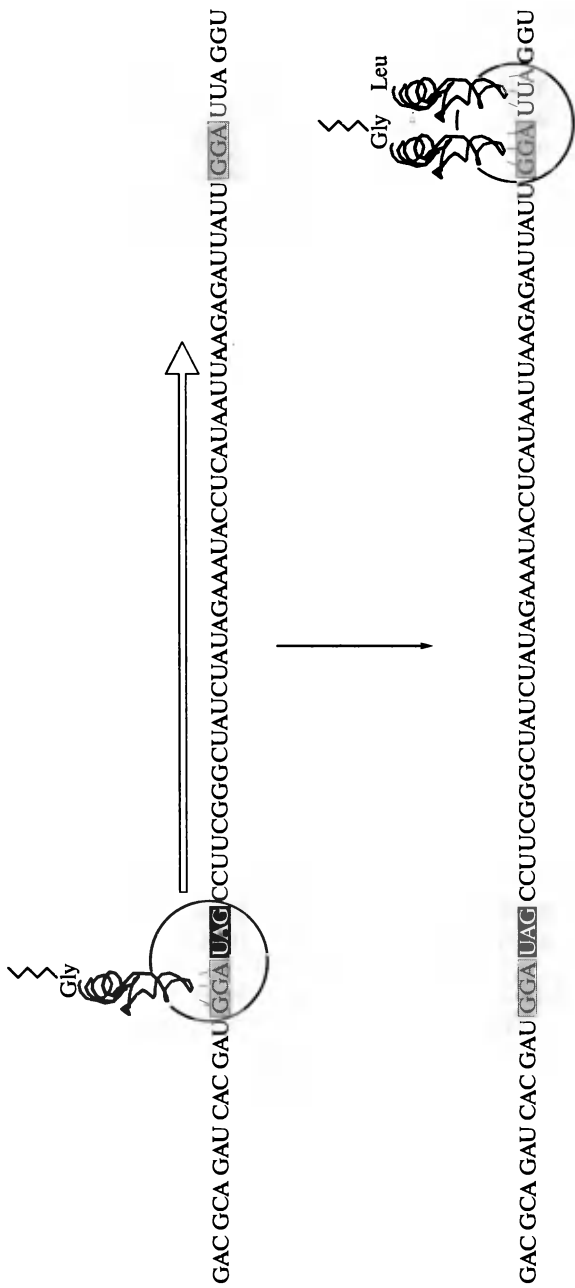


Рис. 11.9. «Прыжок» рибосомы через 50 нуклеотидных остатков при трансляции мРНК, кодирующей ДНК-топиизомеразу бактериофага Т4 (транскрипт гена 60).

Huang et al. (1988) *Science* **239**: 1005—1012

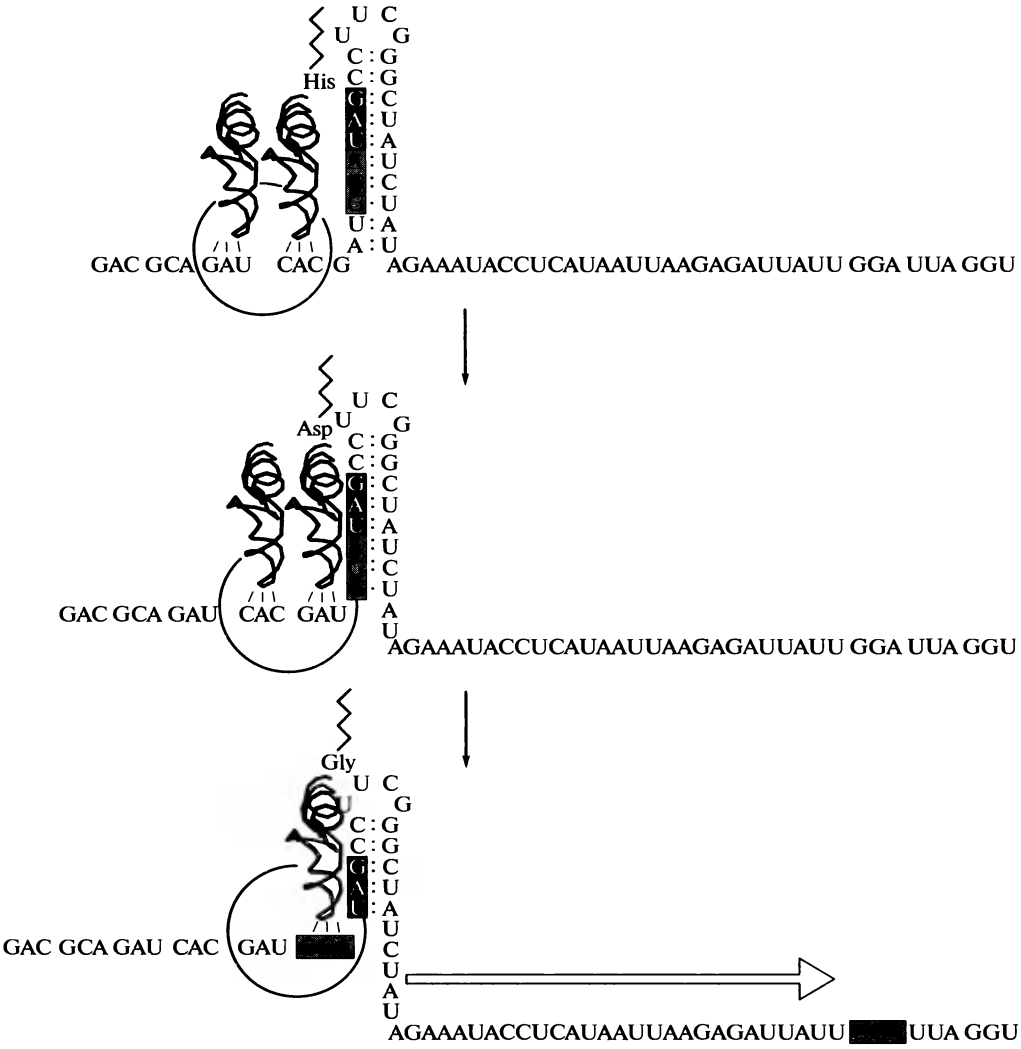


Рис. 11.10. Структурные предпосылки и последовательность событий при «прыжке» рибосомы через 50 нуклеотидных остатков в процессе трансляции мРНК, кодирующей ДНК-топоизомеразу бактериофага Т4.

Пояснения см. в тексте.

Huang et al. (1988) *Science* **239**: 1005—1012. См. также Weiss et al. (1990) in *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill et al.), pp. 534—540. ASM Press, Washington, D.C.

успешного «прыжка» рибосомы через 50-нуклеотидный участок последний должен иметь специфическую структуру. Необходимыми элементами этой структуры являются стоп-кодон непосредственно после стартового для «прыжка» глицинового кодона (т.е. со стороны 3'-конца), стабильная шпилька в начальном участке «прыжка», идентичный стартовому глициновый кодон в участке мРНК, куда совершается «прыжок», а также надлежащий размер перескакиваемого участка (рис. 11.10). Помимо этого аминокислотная последовательность синтезируемого пептида, исходящего из ПТЦ (14 ближайших аминокислотных остатков), также вносит свой вклад в эффективность «прыжка». По всей видимости, оста-

новка на стоп-кодоне и наличие в этом же районе стабильной шпильки провоцируют начало «прыжка», и рибосома проскакивает структурированный участок мРНК, шунтируя всю проскакиваемую область без ее расплетания. Начало «прыжка», шунтирование участка матрицы и «приземление» рибосомы на новом, расположенном ближе к 3'-концу, кодоне может рассматриваться как явление *рекодирования* в процессе трансляции (см. обзоры: Atkins, J. F., and Gesteland, R. F., et al., 1999, 2006).

Другой пример рибосомных «прыжков» — случай трансляции *trpR* мРНК *E. coli* (Бенхар и Энгельберг-Кулка, 1993). Ген *trpR E. coli* кодирует триптофановый репрессор, белок с молекулярной массой 12 кДа, регулирующий транскрипцию нескольких оперонов и генов, вовлеченных в метаболизм и транспорт триптофана. Было обнаружено, что, наряду с основным продуктом трансляции, на той же мРНК синтезируется некоторое количество другого белка молекулярной массой около 10 кДа. N-концевая часть этого короткого белка идентична таковой у полноразмерного репрессора, тогда как С-концевая часть совершенно другая. Было показано, что в процессе трансляции на специфическом участке мРНК рибосома изредка (с частотой около 5 %) перескакивает через сегмент мРНК длиной 55 нуклеотидов, что приводит к сдвигу рамки +1 и укорочению полипептида. В отличие от предыдущего случая (мРНК ДНК-топоизомеразы фага Т4) здесь не наблюдается ни пары одинаковых кодонов на границах проскакиваемого участка, ни стабильной вторичной структуры у старта, ни стоп-кодона в начале проскакиваемого участка. Вместо этого для перескока необходимо наличие пяти специфических кодонов (AUG AGC CAG CGU GAG), следующих за неспецифической последовательностью длиной более 10 кодонов. Была выдвинута гипотеза о выпетливании из мРНК соответствующей последовательности и, таким образом, тесном сближении границ проскакиваемого участка. Можно допустить, что транслирующая рибосома в процессе транслкации может переключиться с кодона, связанного с ней, на кодон, смежный в пространственном отношении, но расположенный относительно далеко по цепочке мРНК. Этот случай также может рассматриваться как пример рекодирования.

Существует особый случай рекодирования, когда транслирующая рибосома может перескакивать с одной матрицы на другую. Этот феномен был назван «*транс-трансляцией*» (Аткинс и Гестланд, 1996). В клетках *E. coli*, а также в бесклеточных экстрактах содержится, среди прочих «малых» РНК, так называемая 10Sa РНК (длиной 363 нуклеотида), участок которой кодирует декапептид (Ala-Asn-Asp-Gly-Asn-Tyr-Ala-Leu-Ala-Ala). Последний часто обнаруживается на С-концах незавершенных полипептидных цепей, синтезированных на мРНК, лишенных стоп-кодонов вследствие частичной 3'-концевой экзонуклеазной деградации. Эта 10-аминокислотная добавка к полипептидной цепи служит меткой, которая узнается бактериальной протеолитической системой, и таким образом незавершенный полипептид подвергается быстрой деградации. Было показано, что 10Sa РНК аминоацелируется аланином на 3'-конце, как и тРНК^{Ala}. Когда рибосома считывает усеченную с 3'-конца мРНК или синтетическую матрицу без стоп-кодона, она останавливается на 3'-конце, удерживая пептидил-тРНК в Р-участке, а А-участок рибосомы в таком случае остается пустым. Тогда 10Sa РНК входит в пустой, лишенный кодона А-участок (рис. 11.11, рибосомный комплекс слева). В результате реакции транспептидации между ней и пептидил-тРНК ее аланиновый остаток добавляется к

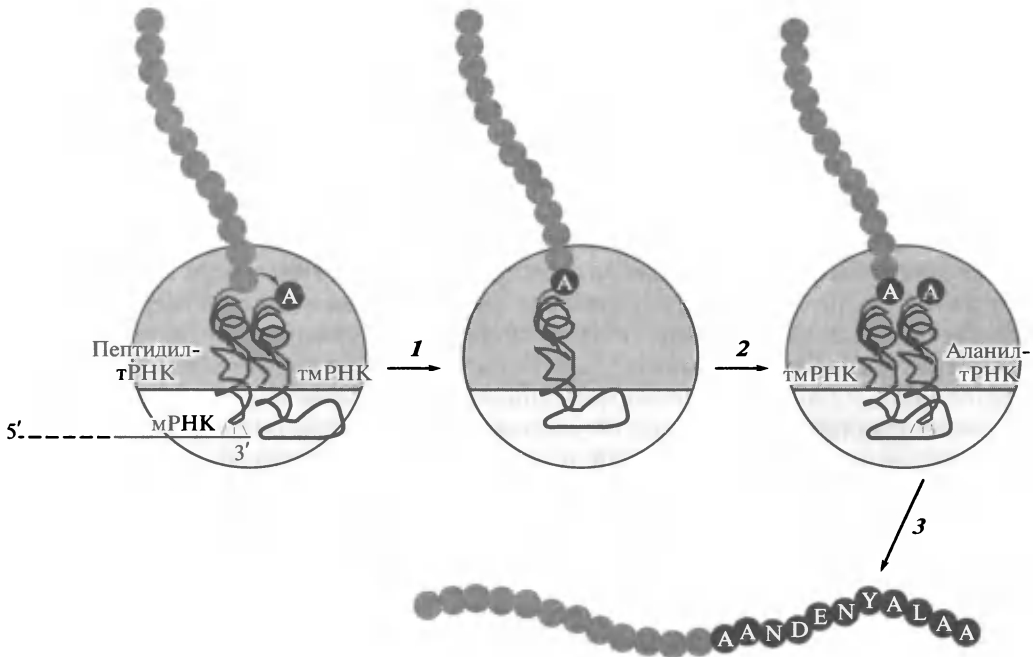


Рис. 11.11. Схема процесса рекодирования, или *транс*-трансляции, с участием тмРНК (10Sa РНК).

1: транслокация 10Sa РНК из *A*-участка в *P*-участок.

2: связывание аланил-тРНК с первым кодоном последовательности 10Sa РНК в *A*-участке.

3: освобождение полипептида после терминции на стоп-кодоне 10Sa РНК.

Пояснения см. в тексте.

Tu et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 9322–9326. Keiler et al. (1996) *Science* **271**: 990–993. Muto et al. (1996) *Biochimie* **78**: 985–991

полипептиду, кодированному усеченной мРНК, и удлиненная пептидил-10Sa РНК занимает позицию пептидил-тРНК в претранслокационной рибосоме, после чего происходит ее транслокация из *A*-участка в *P*-участок (рис. 11.11, реакция **1**). В процессе транслокации 10Sa РНК в *A*-участке рибосомы устанавливается кодирующая последовательность этой РНК — рибосома как бы совершает «прыжок» на первый кодон кодирующей последовательности 10Sa РНК (рис. 11.11, рибосомный комплекс в середине). Затем, начиная со связывания аланил-РНК с первым кодоном кодирующей последовательности 10Sa РНК в *A*-участке (рис. 11.11, реакция **2** и рибосомный комплекс справа), происходит нормальная трансляция десяти кодонов этой кодирующей последовательности, рибосома доходит до стоп-кодона 10Sa РНК и нормально терминирует.

Таким образом, на С-конец недостроенного полипептида добавляются 11 аминокислотных остатков: один (незакодированный аланин) привносится 10Sa РНК как 3'-связанный остаток, и остальные десять добавляются в результате трансляции кодирующей последовательности 10Sa РНК (рис. 11.11, схема полипептида внизу). Так как рассмотренная 10Sa РНК выполняет сначала функцию тРНК, а затем функцию мРНК, она в настоящее время чаще всего обозначается как тмРНК (tmRNA).

11.5.1. Механика

Известные структуры тРНК и рибосомы, свойства пре- и посттранслокационных рибосомных комплексов, а также прямые криоэлектронно-микроскопические и рентгеноструктурные данные о некоторых функциональных комплексах рибосомы позволяют расположить молекулы тРНК и мРНК в этих комплексах и построить достаточно правдоподобную грубую модель взаимных перемещений отдельных доменов рибосомы, тРНК и мРНК в процессе транслокации. Как было отмечено при анализе связывания аминоксил-тРНК с транслирующей рибосомой (см. подразд. 9.1.5), связывание аминоксил-тРНК с *A*-участком рибосомы во время элонгации предполагает, что *P*-участок занят пептидил-тРНК, и антикодоны двух связанных с рибосомой тРНК (в *A*- и *P*-участках) образуют двуспиральные структуры типа *A*-формы с двумя смежными кодонами мРНК. После ухода EF1 (EF-Tu) 3'-концы этих молекул тРНК также оказываются в непосредственной близости друг от друга, а плоскости двух тРНК располагаются приблизительно параллельно друг другу. После транспептидации взаимное расположение молекул тРНК почти не меняется. Однако гибкий ССА-«хвост» молекулы тРНК, сидящей в *P*-участке, утратив сложноэфирную и примыкающую пептидную группы, теряет родство к *p*-участку ПТЦ, так что приобретает тенденцию к перемещению и, как результат начальной стадии транслокации, может закрепляться в *e*-участке большой субъединицы еще до транслокационного сдвига всей молекулы в *E*-участок. В то же время при транспептидации на аминоксил-тРНК, сидящую в *A*-участке, навешивается С-конец растущего пептида с образованием новой пептидной группы, что приводит к появлению родства ССА-«хвоста» этой тРНК с прилегающей сложноэфирной группой к *p*-участку ПТЦ; на начальной стадии транслокации это родство реализуется в смещении ССА-«хвоста» пептидил-тРНК в *p*-участок. Таким образом, после прохождения первой — предварительной — стадии транслокации рибосома содержит комплекс деацилированной тРНК (в *P*-участке, но с 3'-концом в *e*-участке ПТЦ) и пептидил-тРНК (в *A*-участке, но со сложноэфирной группой и 3'-концом в *p*-участке ПТЦ) с комплементарным гексаплетом мРНК. Углы обеих L-образных тРНК обращены к головке малой субъединицы (см. подразд. 8.5 и рис. 8.12). 5'-Конец мРНК находится в направлении L1-выступа большой субъединицы и бокового выступа (платформы) малой субъединицы, а 3'-конец мРНК — в направлении L7/L12-выступа большой субъединицы и вогнутого края малой субъединицы.

Вторая — основная — стадия транслокации может быть представлена как сопряженное перемещение двух тРНК и мРНК на расстояние одного триплета мРНК вдоль межсубъединичного канала рибосомы, образованного «шеей» малой субъединицы и желобом под центральным выступом большой субъединицы, в направлении от L7/L12-выступа к L1-выступу, или от вогнутого края малой субъединицы к ее боковому выступу (см. рис. 8.1 и 8.12). В результате перемещения деацилированная тРНК освобождается из *P*-участка и, возможно, диссоциирует из комплекса с кодоном, временно и непрочно задерживаясь в *E*-участке; остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК теперь попадает в *P*-участок, тогда как *A*-участок с установленным там новым кодоном оказывается свободен. Это и есть посттранслокационное состояние рибосомы (см. рис. 11.1, *справа*).

11.5.2. Энергетика

Какая же сила обеспечивает перемещение пептидил-тРНК из *A*- в *P*-участок рибосомы в процессе транслокации? Поскольку за перемещением следует диссоциация деацелированной тРНК из рибосомы, этот процесс должен оказываться энтропийно выгодным. Во всяком случае в процессе бесфакторной (неэнзиматической) транслокации не просматривается какой-либо специальной движущей силы, кроме теплового движения. Похоже, что именно тепловое движение индуцирует перемещение также и в процессе транслокации, катализируемой EF-G•GTP, а присоединение EF-G с ГТФ к рибосоме создает лишь специфическое структурное окружение, в котором стерические и энергетические барьеры на пути перехода оказываются сниженными.

Вообще вопрос об энергетике транслокации долгое время был сильно запутан ввиду ряда исторических причин и из-за традиционности мышления биохимиков. Участие ГТФ в процессе транслокации стало известно раньше всех остальных фактов, касающихся этой стадии элонгационного цикла. Рассмотрение транслокации как процесса механического перемещения крупных молекулярных масс и факт сопряженного расщепления ГТФ на ГДФ и ортофосфат наводили на мысль об аналогии с мышечным сокращением, происходящим за счет энергии гидролиза АТФ до АДФ и ортофосфата. Эта аналогия создала мощный психологический стимул для выдумывания особых энергетических проблем в процессе транслокации, которые должны бы были решаться за счет энергии расщепления ГТФ. Большинство моделей транслокации предполагали, что энергия именно EF-G-опосредованного гидролиза ГТФ так или иначе необходима для механической работы по активному перемещению лигандов (тРНК, мРНК) в рибосоме или хотя бы активному выталкиванию рибосомных лигандов (тРНК) из их участков связывания. Соответственно функция сократительных белков часто приписывалась фактору EF-G и/или белку L7/L12. Согласно одним моделям, энергия ГТФ через EF-G прилагается к пептидил-тРНК, занимающей *A*-участок, так что развиваемое усилие сдвигает ее вместе со своим кодоном по направлению к *P*-участку, вытесняя деацелированную тРНК из *P*-участка. В других моделях энергия ГТФ реализуется через фактор EF-G сначала для удаления (выталкивания) деацелированной тРНК из *P*-участка, и тогда пептидил-тРНК спонтанно переходит из *A*-участка в освободившийся *P*-участок, к которому имеет более сильное сродство. Существует также целый ряд дилетантских моделей, в которых EF-G представляется «подлинным молекулярным мотором», «толкающей» или «тянущей силой», работающим «как пружина» и непосредственно «перематывающим ленту мРНК».

Однако, как уже указывалось, никакого сопряжения реакции гидролиза ГТФ непосредственно с транслокацией нет. Кроме того, было показано, что в реакции гидролиза происходит прямой перенос фосфатного остатка от ГТФ на воду, без образования промежуточного фосфорилированного соединения, которое могло бы обеспечить такое сопряжение (Уэбб и Экклстон, 1981). Следовательно, остается предположить другой механизм: транслокация сопряжена со связыванием EF2 на рибосоме, в то время как гидролиз ГТФ требуется только для освобождения рибосомы от EF2.

Действительно, было показано, что транслокация может идти спонтанно, без EF-G и ГТФ («неэнзиматическая», или бесфакторная, транслокация; см. подразд. 11.3 и рис. 11.5). Следовательно, процесс термодинамически разрешен (процесс

«с горы»), или, другими словами, термодинамический потенциал (свободная энергия) претранслокационного состояния рибосомы выше, чем таковая посттранслокационного состояния. В такой ситуации затрат энергии для совершения полезной работы (поднятия потенциала) не требуется. Таким образом, какой бы то ни было термодинамический вклад EF-G с ГТФ в процесс транслокации необходимо исключить.

Тем не менее в транслокации, катализируемой EF-G, белок EF-G с ГТФ присоединяется к рибосоме и затем ГТФ гидролизуется, т. е. дополнительная свободная энергия тратится. Какова цель этих энергетических затрат? Любая энергия может затрачиваться либо на совершение полезной работы против термодинамического потенциала (проведение процесса «в гору»), либо на преодоление барьеров в спонтанном («с горы») процессе без накопления полезной работы. Исключая первую альтернативу, остается заключить, что вклад ГТФ — чисто кинетический: вначале взаимодействие ГТФ с EF-G обеспечивает связывание EF-G • GTP с рибосомой и тем самым уменьшение барьеров в ходе транслокации, а затем гидролиз ГТФ снимает барьер, поставленный самим EF-G, и транслокация завершается путем распада промежуточного состояния (интермедиата) транслокации. Таким образом, энергия ГТФ тратится на преодоление кинетического барьера и в конечном счете диссипирует в тепло (Четверин и Спиринов, 1982). В данном случае особенность катализа заключается в том, что он энергозависим, как и катализ связывания аминоксил-тРНК с участием EF-Tu и ГТФ.

11.6. Ингибиторы транслокации

Так как в транслокацию вовлечены обе рибосомные субъединицы, этот этап элонгации может быть ингибирован агентами, специфически воздействующими или на большую, или на малую субъединицы. Выделяют три типа механизмов ингибирования транслокации: закрепление остатков тРНК в их *A*- и/или *P*-участках малой субъединицы; запрещение взаимодействия EF-G • GTP с факторсвязывающим участком на большой субъединице; непосредственное вмешательство в события внутририбосомных передвижений, включая возможные межсубъединичные взаимодействия. Целый ряд специфических ингибиторов транслокации представлен антибиотиками (см. обзоры: Pestka, S., 1969; Cundliffe, E., 1980, 1990; Gale, E. F., et al., 1981).

11.6.1 Аминогликозиды и аминоциклитолы

Неомицин, канамицин и гентамицин (см. рис. 9.11) были описаны как ингибиторы транслокации наряду с их действием на связывание аминоксил-тРНК и их эффектом ложного кодирования (см. подразд. 9.3.2). Прокариотические рибосомы заметно более чувствительны к действию этих антибиотиков, чем эукариотические. Ингибиторное воздействие данных антибиотиков на транслокацию основано на их специфическом связывании с малой рибосомной субъединицей. Что касается механизма ингибиторного эффекта, то, по-видимому, связывание этих поликатионных антибиотиков с рибосомой увеличивает сродство рибосомного *A*-участка к тРНК и тем самым препятствует выходу остатка тРНК пептидил-тРНК из *A*-участка в процессе транслокации.

Спектиномицин (рис. 11.12) — представитель родственной группы антибиотиков — аминоциклитолов. В отличие от аминогликозидов он способен ингибировать только бактериальные рибосомы. Участок его связывания также расположен на 30S рибосомной субъединице, и в этом взаимодействии основную роль играет тоже 16S рРНК. Однако место его расположения на малой субъединице рибосомы другое, чем в случае аминогликозидов: он связывается со спиралью

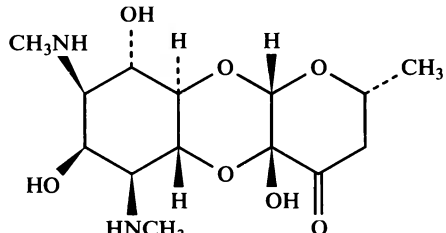


Рис. 11.12. Спектиномицин

h34 в непосредственной близости от декодирующего центра *A*-участка (см. рис. 9.12), взаимодействуя с нуклеотидами C1063 — G1064 и C1192 данной спирали (см. рис. 8.13) (Картер, Рамакришнан и др., 2000; см. также обзор: Noller, H. F., et al., 1990). Мутации в позиции C1192 той же спирали выражаются в появлении устойчивости к препарату (см. обзор: Cundliffe, E., 1990). Тот же самый эффект имеют мутации в рибосомном белке S5, петля которого находится вблизи спектиномицинсвязывающего участка. При этом спектиномицин не ингибирует связывания аминоацил-тРНК и не стимулирует ее ошибочного связывания. Считается, что он влияет на транслокационный этап элонгационного цикла. Механизм его действия неизвестен, однако, по аналогии с аминогликозидами, можно предполагать, что он препятствует выходу остатка тРНК из *A*-участка в процессе транслокации. Была высказана гипотеза, что жесткая структура связанного антибиотика стабилизирует претранслокационную конформацию «шейного» района 30S рибосомной субъединицы, блокируя структурный переход спирали h34, необходимый для поворота головки в ходе транслокации (Рамакришнан и др., 2000).

11.6.2. Виомицин (туберактиномицин)

Виомицин — это циклический основной полипептид (рис. 11.13). Он является мощным ингибитором бактериальных рибосом, блокируя стадию транслокации элонгационного цикла. Как нормальная транслокация с участием EF-G, так и бесфакторная транслокация ингибируются виомицином. Следовательно, ингибирующее действие виомицина направлено непосредственно на присущий рибосоме транслокационный механизм, а не на каталитический эффект EF-G. Этот антибиотик можно рассматривать как наиболее специфический ингибитор транслокации в бактериальной рибосоме.

Антибиотик довольно стабильно и специфически связывается как с полной 70S рибосомой, так и с изолированной большой (50S) субъединицей, но не с малой (30S) субъединицей. Связывание антибиотика приводит к защите от химических агентов района спирали H38 (остатки U913 и G914) домена II 23S рРНК, а метилирование G745 в торцевой петле шпильки H35 того же домена II обеспечивает устойчивость к антибиотику. Следует отметить, что торец спирали H38 образует один из функционально важных контактов между субъединицами в районе межсубъединичного канала рибосомы, со стороны центрального выступа большой субъединицы. Спираль H38 23S рРНК — это так называемый ASF (*A-Site Finger*), торчащий от межсубъединичной поверхности 50S субъединицы к 30S субъединице, параллельно молекулам тРНК, связанным в *A*- и *P*-участках, и в процессе транс-

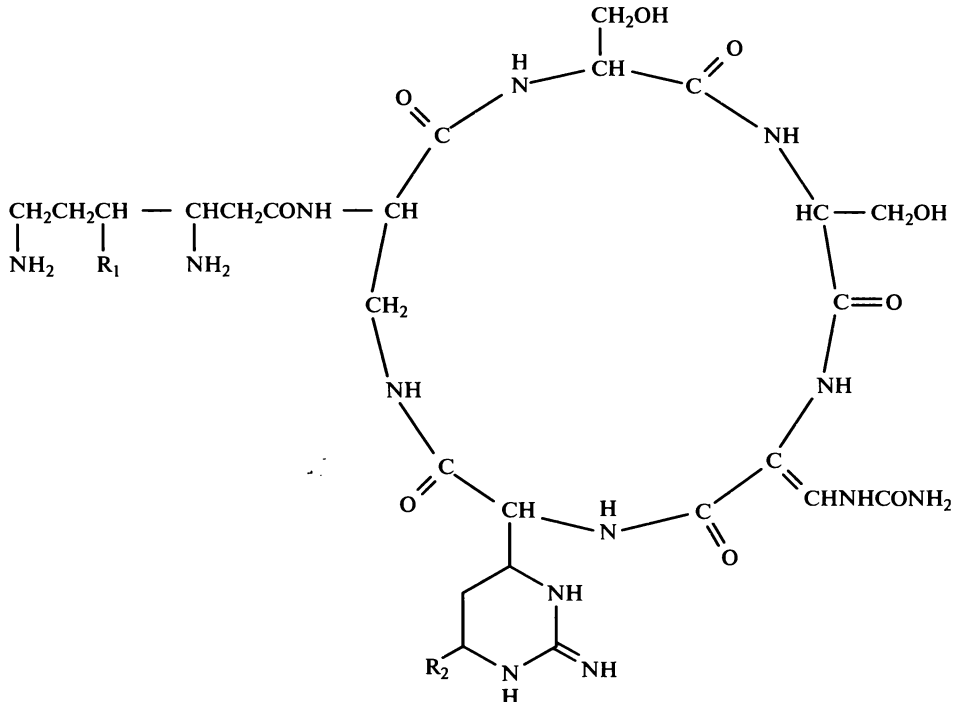


Рис. 11.13. Виомицин, или туберактиномицин

локации помогающий, возможно, перемещению тРНК в *P*-участок. Для малой субъединицы также были описаны мутации, приводящие к устойчивости против антибиотика, например G1491 в верхней части спирали h44 16S рРНК, т.е. в районе другого контакта между субъединицами в области межсубъединичного канала, но уже со стороны тела малой и большой субъединиц. Оба контакта расположены у границы между *A*- и *P*-участками. Все изложенное наводит на мысль о важной роли этих межсубъединичных мостиков в механизме действия виомицина на транслокацию.

Действительно, было показано, что виомицин стабилизирует ассоциацию субъединиц в бактериальной 70S рибосоме, а виомицинустойчивые мутантные рибосомы характеризуются более лабильной ассоциацией субъединиц. Следовательно, связывание виомицина с рибосомой либо приводит непосредственно к стабилизации межсубъединичных контактов, либо вызывает какие-то нарушения межсубъединичных мостиков и сдвиг к более тесной ассоциации субъединиц в рибосоме. В настоящее время имеются основания полагать, что транслокация в рибосоме сопряжена с определенной межсубъединичной подвижностью (см. гл. 18), и именно ограничение межсубъединичной подвижности связанным виомицином может приводить к специфическому ингибированию транслокации. Имеются прямые экспериментальные данные, показывающие, что связанный виомицин фиксирует рибосому в «гибридном» (*A/p*, *P/e*) состоянии транслокационного интермедиата (Ермоленко, Ноллер и др., 2007). Возможно, эта фиксация, вместе со стабилизацией межсубъединичной ассоциации, препятствует EF-G-индуцированному переходу к «открытому», или «разомкнутому», состоянию рибосомы, необходимому для передвижения остатков тРНК при транслокации.

11.6.3. Тиострептон

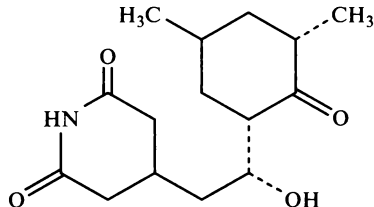
Тиострептон (см. подразд. 9.3.3) и родственные антибиотики (сиомицин, тиопептин, спорангиомицин) — крупные циклические структуры с тиазольным кольцом и пептидными связями (см. рис. 9.13). Эти соединения ингибируют связывание EF-G•GTP, так же как и EF-Tu•GTP, с большой субъединицей бактериальной рибосомы. Они взаимодействуют с рибосомой в районе основания L7/L12-стержня, т. е. приблизительно в том же самом месте, для которого было показано связывание EF-G (и EF-Tu) (см. подразд. 9.3.3). Белок L11 и участок рРНК, который представляет собой трехходовую спиральную структуру H42-H43-H44 домена II 23S рРНК — так называемый «ГТФазный район» (см. рис. 6.2, А), непосредственно участвуют в связывании тиострептона. Две шпильки (H43 и H44) защищаются тиострептоном от химических модификаций. Удивительно, что некоторые устойчивые к тиострептому мутанты и штаммы лишены белка L11 как компонента 50S рибосомной субъединицы. Специфическое ферментативное метилирование в положении A1067 также вызывает устойчивость к антибиотику и нарушает сродство рибосомы к нему. Тиострептон непосредственно защищает нуклеотид A1067 от химических модификаций и покрывает белок L11 при связывании.

Скорее всего для связывания тиострептона необходима определенная конформация обсуждаемого участка 23S рРНК, а белок L11 поддерживает и стабилизирует эту структуру. Антибиотик связывается непосредственно с рРНК, а не с белком. Похоже, что массивная молекула прочно связанного тиострептона механически блокирует рибосомный участок взаимодействия с EF-G (и EF-Tu). В результате этого EF-G не может взаимодействовать с претранслокационной рибосомой, и катализа транслокации не происходит. Из-за отсутствия взаимодействия зависимый от рибосомы и катализируемый EF-G гидролиз ГТФ, включая несопряженный гидролиз, также ингибируется тиострептоновыми антибиотиками.

11.6.4. Фусидовая кислота

Фусидовая кислота — это антибиотик стероидной природы (см. рис. 11.4), эффективно воздействующий на бактериальный белковый синтез. Он влияет на взаимодействие EF-G с рибосомой; его мишенью является сам EF-G, но не факторсвязывающий участок рибосомы. Соответственно мутационные изменения, вызывающие устойчивость к фусидовой кислоте, располагаются в EF-G. Фусидовая кислота не блокирует связывание EF-G•GTP с рибосомой и последующий гидролиз ГТФ. Напротив, антибиотик ингибирует освобождение EF-G•GDP из рибосомы после гидролиза ГТФ. Транслокация, катализируемая EF-G, или, по крайней мере, ее первая стадия (образование промежуточного состояния транслокации), видимо, протекают нормально в присутствии фусидовой кислоты. Ингибирование трансляции происходит главным образом из-за задержки EF-G•GTP в факторсвязывающем участке посттранслокационной рибосомы: присутствие EF-G блокирует следующий этап элонгационного цикла, а именно связывание аминоацил-тРНК.

Механизм увеличения сродства EF-G•GDP к рибосоме в присутствии фусидовой кислоты не совсем ясен. Существуют две возможности: либо фусидовая кислота закрепляет ГТФ-конформацию EF-G даже после гидролиза ГТФ, что



выражается в сохранении сродства к рибосоме, либо EF-G приобретает ГДФ-конформацию, но фузидовая кислота придает белку дополнительное сродство к рибосоме.

11.6.5. Глутаримиды

Наиболее типичный представитель этой группы антибиотиков — циклогексимид, прежде называвшийся актидионом (рис. 11.14). Он состоит из β -глутаримидного кольца и циклического кетона, соединенных гидроксипропиловым мостиком. Антибиотик специфически ингибирует эукариотические рибосомы. Было показано, что его мишенью является большая (60S) рибосомная субъединица. Мутации в некоторых белках большой субъединицы рибосомы дрожжей и млекопитающих вызывают устойчивость к антибиотику. Циклогексимид не ингибирует пептидилтрансферазную реакцию. Известно, что антибиотик стабилизирует эукариотические полирибосомы и предотвращает выход новосинтезируемого полипептида, вызываемый пурамицином; поэтому считается, что циклогексимид ингибирует этап транслокации. Механизм его действия не известен.

11.6.6. Неспецифические агенты, ингибирующие транслокацию

Транслокация выглядит наиболее уязвимой стадией элонгационного цикла, поскольку она может быть ингибирована множеством разнообразных неспецифических агентов и условий среды. Например, повышенная концентрация ионов Mg^{2+} является сильным ингибитором транслокации. В бактериальных бесклеточных системах увеличение концентрации Mg^{2+} до 30 мМ (при 100 мМ KCl) специфически останавливает элонгационный цикл на этапе транслокации. Другими словами, высокая концентрация Mg^{2+} фиксирует рибосому в претранслокационном состоянии. Наоборот, низкие концентрации Mg^{2+} стимулируют транслокацию. Один из основных факторов в таких эффектах Mg^{2+} — прямая зависимость связывания тРНК с тРНК-связывающими участками рибосомы от Mg^{2+} : и сродство (константа связывания), и кинетика (константа скорости) сильно зависят от концентрации Mg^{2+} . Таким образом, следствием может быть просто задержка остатков тРНК в *A*- и *P*-участках рибосомы и соответственно препятствие их перемещению. Кроме того, было показано, что другой эффект высокой концентрации Mg^{2+} — «замораживание» конформационного перехода рибосомы из состояния *A/a*, *P/p* после транспептидации в «гибридное» состояние *A/p*, *P/e* (см. рис. 8.15, **B**) на начальном этапе транслокации (Ермоленко, Ноллер и др., 2007).

Низкая температура действует на транслокацию таким же образом. Именно транслокационный этап элонгационного цикла первым реагирует на понижение

температуры и блокируется. При низкой температуре (например, при 4 °С) работающие рибосомы останавливаются, находясь в основной массе в претранслокационном состоянии.

11.7. Резюме: последовательность событий и молекулярные механизмы

Предполагаемая последовательность событий, имеющих место в процессе транслокации с участием EF2, схематически изображена на рис. 11.15. Первым событием должно быть взаимодействие претранслокационной рибосомы с EF-G и ГТФ. Однако в экспериментальных условиях стабильного комплекса претранслокационной рибосомы с EF-G•GTP или с EF-G•GMP-PCP обнаружено не было. Оказалось, что EF-G•ГТФ имеет сильное специфическое сродство не к исходному претранслокационному состоянию рибосомного комплекса, а к транслокационному «гибридному» интермедиату — промежуточному состоянию транслокации и затем, по-видимому, к переходному конформационному состоянию рибосомы. Действительно, EF-G (EF2) с ГТФ взаимодействует с «гибридным» состоянием рибосомы A/p , P/e , достигаемым в результате спонтанного посттранспептидационного сдвига 3'-концевых участков тРНК (см. подразд. 10.4 и рис. 10.5). На рис. 11.15 этот спонтанный сдвиг представлен как равновесие между «несдвинутым» состоянием A/a , P/p и «сдвинутым» состоянием A/p , P/e (стадия 1). Экспериментально показано, что EF-G с нерасщепляемым аналогом ГТФ хорошо связывается с рибосомой в «сдвинутом» состоянии и стабилизирует его (стадия 2). При этом происходит внедрение удлиненного домена IV фактора EF-G в A-участок на малой рибосомной субъединице и дестабилизация положения остатка тРНК в этом участке (возможно, установление переходного состояния A^*). Вероятно, именно в этом состоянии (состояние A^*/p , P/e , см. рис. 11.15, III) кодон-антикодоновые контакты ослаблены и мРНК может проскальзывать относительно тРНК, приводя к сдвигам рамки считывания (транслокационные ошибки, см. подразд. 11.4.2).

Третье событие, изображенное на схеме (стадия 3), включает в себя гидролиз ГТФ. В результате гидролиза ГТФ появляется междоменная подвижность EF-G (EF2), его конформация «расслабляется», что дает возможность остаткам тРНК перейти из A- и P-участков соответственно в P- и E-участки на малой субъединице рибосомы. Большая субъединица рибосомы прочно удерживает EF2 до тех пор, пока не происходит гидролиз ГТФ. Если ГТФ заменен на его нерасщепляемый аналог (например, GMP-PCP), то третье событие не имеет места, и рибосома продолжает быть прочно связана с комплексом EF-G•GMP-PCP. Гидролиз ГТФ и его превращение в ГДФ приводит к изменению конформации EF2, в результате чего белок теряет сродство к рибосоме.

Таким образом, после гидролиза ГТФ EF-G•GDP обнаруживается в составе непрочного комплекса с посттранслокационной рибосомой, который самопроизвольно диссоциирует, т.е. EF-G и ГДФ освобождаются из рибосомы, что сопровождается также выходом деацелированной тРНК (стадия 4). Фусидовая кислота специфически ингибирует именно эту стадию процесса путем фиксации комплекса EF-G•GDP на рибосоме, тем самым блокируя завершающую фазу транслокации.

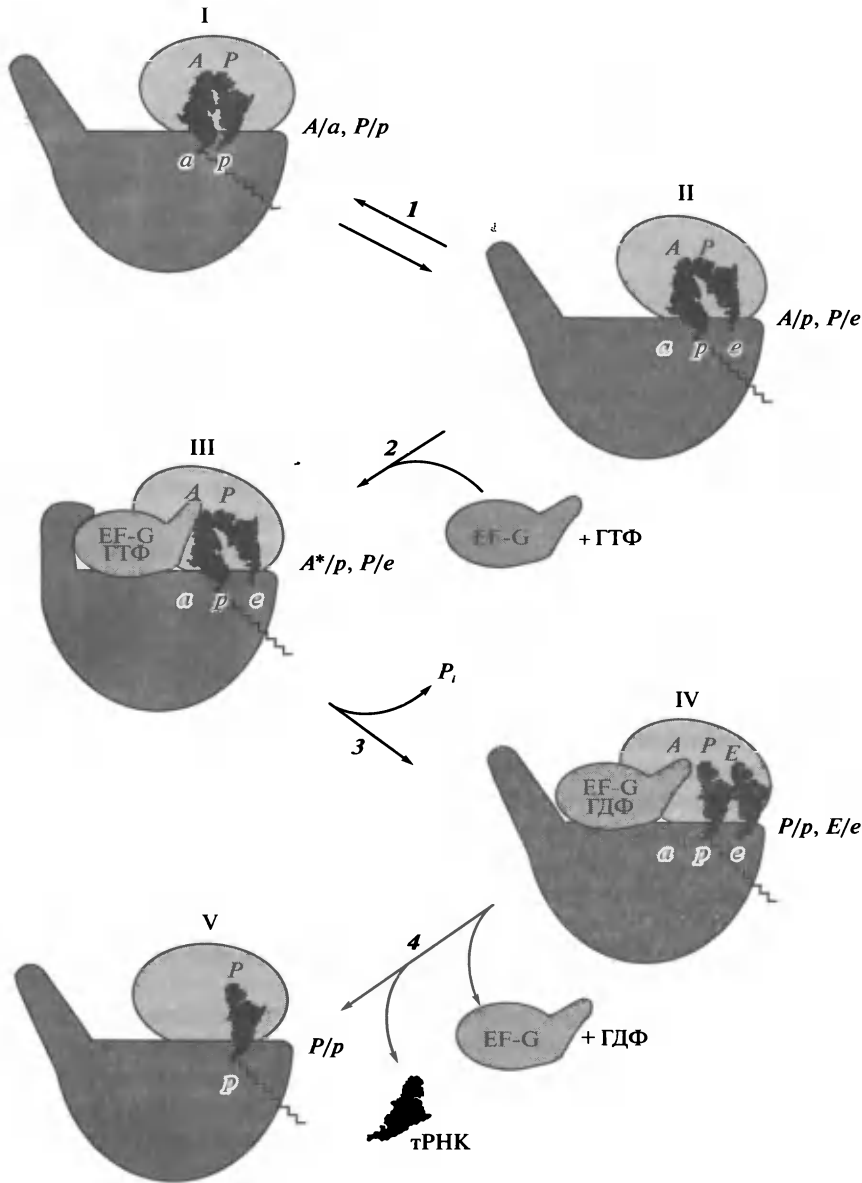


Рис. 11.15. Схема предполагаемой последовательности событий в ходе EF-G•GTP-катализируемой транслокации.

Пояснения см. в тексте

В целом последовательность событий, показанная на рис. 11.15, напоминает такую при связывании аминоктил-тРНК с участием EF-Tu (см. рис. 9.17): за начальным кратковременным взаимодействием следует быстрая (катализируемая) стадия основного этапа, за которой, в свою очередь, следует гидролиз ГТФ; последней стадией является освобождение из рибосомы белкового фактора вместе с ГДФ. Такая симметрия элонгационного цикла и отображена на рис. 11.5.

- Гаврилова, Л. П., и Спири́н, А. С. (1972). Изучение механизма транслокации в рибосомах. II. Активация спонтанной («неэнзиматической») транслокации в рибосомах *Escherichia coli* парахлормеркурибензоатом. *Молекул. биол.* **6**: 311—319.
- Atkins, J. F., and Gesteland, R. F. (1996). A case for *trans* translation. *Nature* **379**: 769—770.
- Belitsina, N. V., and Spirin, A. S. (1979). Ribosomal translocation assayed by the matrix-bound poly(uridylic acid) column technique. *Eur. J. Biochem.* **94**: 315—320.
- Belitsina, N. V., Glukhova, M. A., and Spirin, A. S. (1975). Translocation in ribosomes by attachment-detachment of elongation factor G without GTP cleavage: Evidence from a column-bound ribosome system. *FEBS Letters* **54**: 35—38.
- Belitsina, N. V., Glukhova, M. A., and Spirin, A. S. (1976). Stepwise elongation factor G-promoted elongation of polypeptides on the ribosome without GTP cleavage. *J. Mol. Biol.* **108**: 609—613.
- Belitsina, N. V., Tnalina, G. Z., and Spirin, A. S. (1981). Template-free ribosomal synthesis of polylysine from lysyl-tRNA. *FEBS Letters* **131**: 289—292.
- Benhar, I., and Engelberg-Kulka, H. (1993). Frameshifting in the expression of the *E. coli trpR* gene occurs by the bypassing of a segment of its coding sequence. *Cell* **72**: 121—130.
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**: 340—348.
- Chetverin, A. B., and Spirin, A. S. (1982). Bioenergetics and protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **683**: 153—179.
- Ermolenko, D. N., Spiegel, P. C., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007). The antibiotic viomycin traps the ribosome in an intermediate state of translocation. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 493—497.
- Fredrick, K., and Noller, H. F. (2003). Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin. *Science* **300**: 1159—1162.
- Gavrilova, L. P., and Spirin, A. S. (1971). Stimulation of «non-enzymatic» translocation by *p*-chloromercuribenzoate. *FEBS Letters* **17**: 324—326.
- Gavrilova, L. P., and Spirin, A. S. (1972). A modification of the 30S ribosomal subparticle is responsible for stimulation of «non-enzymatic» translocation by *p*-chloromercuribenzoate. *FEBS Letters* **22**: 91—92.
- Gavrilova, L. P., Koteliansky, V. E., and Spirin, A. S. (1974). Ribosomal protein S12 and «non-enzymatic» translocation. *FEBS Letters* **45**: 324—328.
- Gavrilova, L. P., Kostiashkina, O. E., Koteliansky, V. E., Rutkevich, N. M., and Spirin, A. S. (1976). Factor-free ('non-enzymic') and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* **101**: 537—552.
- Huang, W. M., Ao, S. Z., Casjens, S., Orlandi, R., Zeikus, R., Weiss, R., Winge, D., and Fang, M. (1988). A persistent untranslated sequence within bacteriophage T4 DNA topoisomerase gene 60. *Science* **239**: 1005—1012.
- Laurberg, M., Kristensen, O., Martemyanov, K., Gudkov, A. T., Nagaev, I., Hughes, D., and Liljas, A. (2000). Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J. Mol. Biol.* **303**: 593—603.
- McGarry, K. G., Walker, S. E., Wang, H., and Fredrick, K. (2005). Destabilization of the P site codon-anticodon helix results from movement of tRNA into the P/E hybrid state within the ribosome. *Mol. Cell* **20**: 613—622.
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**: 142—148.
- Pestka, S. (1969). Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complex. VI. Oligopeptide synthesis and translocation on ribosomes in the presence and absence of soluble transfer factors. *J. Biol. Chem.* **244**: 1533—1539.

- Riddle, D. L., and Carbon, J. (1973). Frame-shift suppression: A nucleotide addition in the anticodon of a glycine transfer RNA. *Nature New Biol.* **242**: 230—234.
- Spiegel, P. C., Ermolenko, D. N., and Noller, H. F. (2007). Elongation factor G stabilizes the hybrid-state conformation of the 70S ribosome. *RNA* **13**: 1473—1482.
- Trifonov, E. N. (1987). Translation framing code and frame-monitoring mechanism as suggested by the analysis of mRNA and 16S rRNA nucleotide sequences. *J. Mol. Biol.* **194**: 643—652.
- Webb, M. R., and Eccleston, J. F. (1981). The stereochemical course of the ribosome-dependent GTPase reaction of elongation factor G from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**: 7734—7737.
- Монографии, сборники и обзоры
- Четверин, А. Б., и Спиринов, А. С. (1983). Биоэнергетика и синтез белка. *Успехи биол. химии* **24**: 3—39.
- Atkins, J., and Gesteland, R. (1995). Discontinuous triplet decoding with or without re-pairing by peptidyl tRNA. In: *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (eds. Söll, D., and RajBhandary, V. L.), pp. 471—490. ASM Press, Washington, D. C.
- Atkins, J. F., Böck, A., Matsufuji, S., and Gesteland, R. F. (1999). Dynamics of the genetic code. In *The RNA World*, Second Edition (eds. Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F.), pp. 637—673. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Atkins, J. F., Gesteland, R. F., Jackson, R. J., and Wills, N. M. (2006). The shapely mRNA: knotting ventured, knotting gained. In *The RNA World*, Third Edition (eds. Gesteland, R. F., Cech, T. R., and Atkins, J. F.), pp. 437—467. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Cundliffe, E. (1980). Antibiotics and prokaryotic ribosomes: Action, interaction, and resistance. In: *Ribosomes: Structure, Function, and Evolution* (eds. Chambliss, G., Craven, G. R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., and Nomura, M.), pp. 555—581. University Park Press, Baltimore.
- Cundliffe, E. (1990). Recognition sites for antibiotics within rRNA. In: *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 479—490. ASM Press, Washington,
- Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M. H., and Waring, M. J. (1981). *The Molecular Basis of Antibiotic Action*. J. Wiley & Sons, London.
- Noller, H. F., Moazed, D., Stern, S., Powers, T., Allen, P. N., Robertson, J. M., Weiser, B., and Triman, K. (1990). Structure of rRNA and its functional interactions in translation. In: *The Ribosomes: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 73—92. ASM Press, Washington, D. C.
- Pestka, S. (1969). Translocation, aminoacyl-oligonucleotides, and antibiotic action. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 395—410.
- Spirin, A. S. (1978). Energetics of the ribosome. *Progress Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **21**: 39—62.
- Spirin, A. S. (1985). Ribosomal translocation: Facts and models. *Progress Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **32**: 75—114.
- Weiss, R., and Cherry, J. (1993). Speculations on the origin of ribosomal translocation. In *The RNA World*, First Edition (eds. Gesteland, R. F., and Atkins, J. F.), pp. 71—89. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Weiss, R., Dunn, D., Atkins, J., and Gesteland, R. (1990). The ribosome's rubbish. In: *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 534—540. ASM Press, Washington, D. C.

СКОРОСТЬ ЭЛОНГАЦИИ И ЕЕ МОДУЛЯЦИЯ

12.1. Скорость элонгации у прокариот и эукариот

В процессе трансляции элонгационный цикл, включающий в себя три основных стадии — связывание аминоктил-тРНК, транспептидацию и транслокацию (см. рис. 8.3), — повторяется столько раз, сколько значащих кодонов присутствует в кодирующей последовательности мРНК. Таким образом, частота циклов определяет скорость элонгации.

12.1.1. «Транзитное время»

Время, в течение которого растущий синтезируемый пептид остается связанным с транслирующей рибосомой, т. е. суммарное время его элонгации и терминции, называется «временем прохождения», или «транзитным временем» (transit time). Если пренебречь временем терминции, то количество аминокислот в данном белке, разделенное на его «транзитное время», дает среднюю скорость элонгации (количество включенных аминокислот в единицу времени) на соответствующей мРНК. Следовательно, определение «транзитного времени» для белков известного размера дает прямую информацию о скорости элонгации (см. обзор Нильсен и МакКонки, 1980).

Обычно для того, чтобы измерить «транзитное время» *in vivo*, к клетке добавляют радиоактивные аминокислоты. Радиоактивность скоро появляется в полирибосомах в растущих синтезируемых полипептидах, связанных с рибосомами. Радиоактивность полирибосомной клеточной фракции увеличивается, пока растущие пептиды удлиняются мечеными аминокислотами (рис. 12.1). Когда все растущие пептиды окажутся полностью радиоактивными, т. е. все их аминокислоты (или данный вид аминокислоты) будут мечеными, радиоактивность полирибосомной фракции выйдет на плато. Время достижения плато и есть «транзитное время».

На практике более удобным и точным является определение «транзитного времени» через кинетику включения радиоактивности во фракцию растворимых (завершенных) белков, свободную от рибосом, и ее сравнение с кинетикой включения метки в тотальную полипептидно-белковую фракцию. Включение радиоактивной метки в растворимые белки сначала происходит экспоненциально, а затем, после достижения плато в полирибосомной фракции, линейно; на этом этапе образуются полностью меченые полипептиды. В то же время очевидно, что общее включение радиоактивной аминокислоты в полипептиды должно происходить линейно практически с самого начала (при условии, что в процессе эксперимента скорость элонгации постоянна). Так как после достижения плато в полирибосомной фракции увеличение содержания радиоактивности и в тотальной, и в растворимой фракции белков определяется одним и тем же процессом выхода меченого полипептида из рибосомы, две эти линейные зависимости на графике должны быть параллельны (см. рис. 12.1, Б). Расстояние между ними по

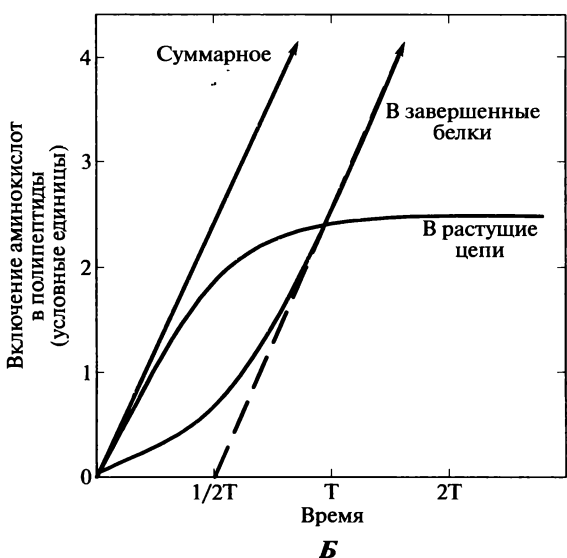
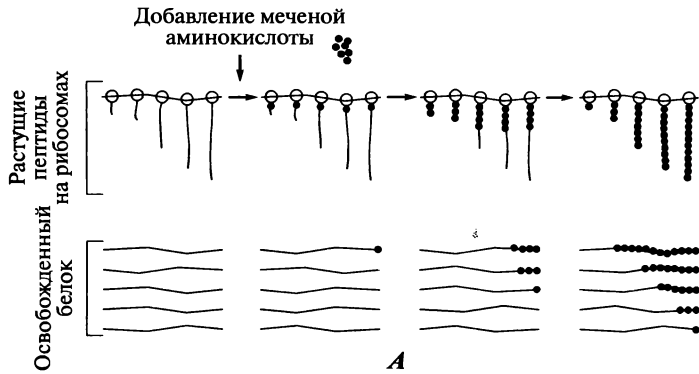


Рис. 12.1. Измерение времени прочтения цепи мРНК рибосомами («транзитное время»).

A: схематическое представление хода накопления радиоактивности во фракции растущих пептидных цепей на рибосомах (фракция полирибосом) и во фракции завершенных свободных белков (супернатантная фракция) после добавления меченой аминокислоты.

B: теоретические кинетические кривые включения радиоактивной аминокислоты в суммарные полипептиды и белки, свободные белки и растущие на рибосомах пептидные цепи. T — «транзитное время».

Nielsen and McConkey (1980) *J. Cell Physiol.* **104:** 269—281

оси абсцисс показывает время, необходимое для завершения синтеза растущих пептидов на полирибосомах. Это время составляет половину «транзитного времени». (Здесь необходимо принимать во внимание, что средняя длина растущих полипептидов в полирибосоме составляет половину длины полностью синтезированных пептидов, т.е. в каждый момент времени полирибосома содержит в среднем наполовину синтезированные полипептиды.)

12.1.2. Средняя скорость элонгации и ее вариации

Измерения «транзитного времени» позволили оценить скорость элонгации различных полипептидов (среднюю частоту элонгационного цикла) в прокариотиче-

ских и эукариотических клетках, а также в бесклеточных системах. У *Escherichia coli* цепи мРНК могут прочитываться со скоростью от 15 до 20 кодонов в секунду при насыщающих концентрациях питательных субстратов и факторов (в богатой среде) при 37 °С (см. монографию: Neidhardt, F. C., 1987). Для бактерий, растущих в бедных средах, более типична скорость 10 кодонов в секунду. Такой же скорости (10 кодонов в секунду) можно достигнуть в бактериальной бесклеточной системе при оптимальных условиях. Таким образом, средняя продолжительность элонгационного цикла в бактериальных системах колеблется в пределах от 0,05 до 0,1 секунды при +37 °С и примерно в три раза больше при +25 °С.

В эукариотических системах скорость элонгации может достигать 10 кодонов в секунду при +37 °С, но обычно она меньше и варьирует в широких пределах из-за наличия механизмов, регулирующих элонгацию. Обычно среднее время эукариотического элонгационного цикла составляет от 0,1 до 0,5 секунды.

В принципе регулироваться может скорость любой стадии элонгационного цикла (связывания аминоацил-тРНК, транспептидации, транслокации), но на самом деле связывание аминоацил-тРНК и транслокация являются наиболее вероятными мишенями для регуляторных механизмов. Если регуляция затрагивает данную стадию всех циклов более или менее равномерно, то частота циклов элонгации в целом может изменяться в ту или другую сторону и, следовательно, общая скорость элонгации будет увеличиваться или уменьшаться. В то же время мишенью регуляторного механизма может быть та или иная стадия одного определенного или всего нескольких определенных элонгационных циклов; например, может быть замедлено связывание аминоацил-тРНК со специфическим кодоном или затруднена транслокация на специфическом участке мРНК. В этом случае элонгация становится неравномерной, т.е. в ходе элонгации возникают *трансляционные паузы*, которые приводят к изменению средней скорости элонгации. Регуляция частоты элонгационных циклов и паузы в ходе трансляции — два основных механизма регуляции средней скорости элонгации.

12.1.3. Профиль полирибосом

Знание абсолютных скоростей элонгации не всегда необходимо для изучения регуляции элонгационного этапа трансляции. Часто достаточно знать лишь относительные изменения скоростей элонгации. Эти параметры можно определить, регистрируя изменения профиля распределения полирибосом при центрифугировании в градиенте сахарозы (рис. 12.2).

Профиль распределения полирибосом зависит от соотношения скоростей инициации, элонгации и терминации. В общем замедление движения рибосомы по мРНК при постоянной скорости инициации выражается в увеличении тяжелой полирибосомной фракции (т.е. в увеличении плотности размещения рибосом на мРНК). Очевидно, что увеличение скорости инициации при неизменной скорости элонгации приведет к такому же результату. Следовательно, анализа профиля полирибосом как такового не всегда оказывается достаточно для того, чтобы судить об изменениях скоростей элонгации; в таких случаях необходима информация об общей скорости трансляции (скорости включения аминокислот в полипептидную цепь).

Могут быть рассмотрены три случая: 1) «облегчение полирибосом» — так называется «легкий сдвиг» в профиле распределения полирибосом, т.е. уменьше-

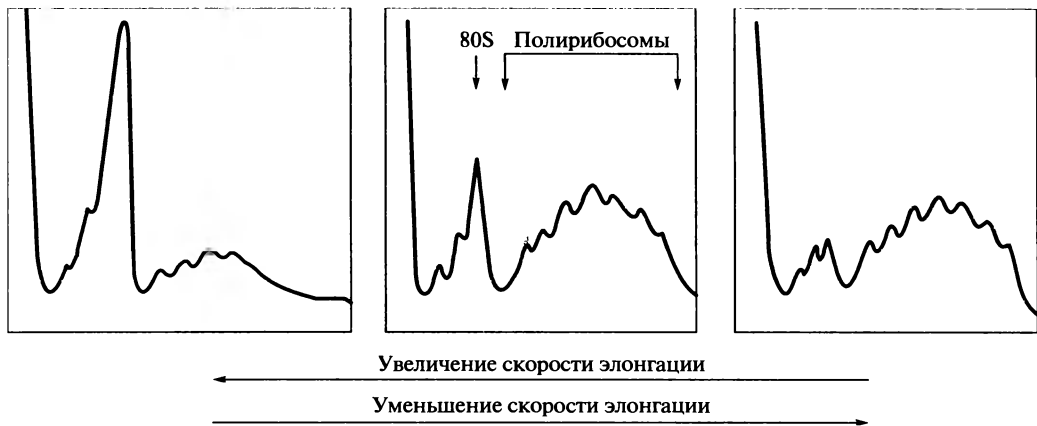


Рис. 12.2. Профили распределения монорибосом и полирибосом при центрифугировании в сахарозном градиенте.

Spirin and Ryazanov (1991) In *Translation in Eukaryotes* (ed. Trachsel), pp. 325–350. CRC Press, Boca Raton, Florida

ние количества рибосом на цепи мРНК, — указывает на увеличение скорости элонгации, если уровень включения аминокислот (скорость трансляции) увеличивается или не меняется; 2) «утяжеление полирибосом» — так называемый «тяжелый сдвиг» в полирибосомах — означает снижение скорости элонгации, если включение аминокислот замедляется или не изменяется; 3) отсутствие сдвигов в профиле полирибосом при ускорении или замедлении включения аминокислот указывает на то, что скорость элонгации увеличивается или уменьшается соответственно.

12.2. Неравномерность элонгации

Частота циклов может рассматриваться только как средняя величина в процессе трансляции всей цепи данной мРНК (см. подразд. 12.1.2). Показано, что скорость элонгации в течение трансляции цепи мРНК может быть непостоянной. Другими словами, рибосома может передвигаться по различным участкам мРНК с различными скоростями.

12.2.1. Трансляционные паузы

Уже давно было замечено, что во время синтеза глобиновых цепей в ретикулоцитах кролика распределение образующихся пептидов по размеру не является непрерывным, а скорее обнаруживает дискретные классы, указывая на возможность периодического замедления движения или остановок в процессе трансляции (элонгации) (Протцел и Моррис, 1974). Позднее результаты, свидетельствующие о неравномерной скорости трансляции, были получены при синтезе самых разнообразных белков как в интактных клетках, так и в бесклеточных системах, включая синтез белка оболочки фага MS2 в клетках *E. coli*, зараженных данным фагом; фиброина шелка; вителлогенина; сывороточного альбумина; препролактинина; препроинсулина; проколлагена; белков вируса энцефаломиокардита; боль-

шой субъединицы рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы хлоропластов; белка D1 реакционного центра хлоропластов; белков вируса табачной мозаики; бактериальных колицинов и т.д. (см. обзор: Candelas, G. C., et al., 1987). Все эти наблюдения привели к заключению, что во время элонгации рибосома движется вдоль цепи мРНК с непостоянной скоростью: время от времени, на некоторых специфических участках мРНК они могут замедлять свое движение или на время останавливаться. Другими словами, во время элонгации, по крайней мере в некоторых случаях, могут возникать более или менее длительные паузы.

Временные остановки на специфических участках мРНК при элонгации полипептида могут играть важную роль в котрансляционном сворачивании белков, котрансляционной сборке больших белков или мембранных белковых комплексов и котрансляционном трансмембранном транспорте. В процессе котрансляционного сворачивания белков, особенно в случае многодоменных белков, правильное сворачивание N-концевой части или домена на рибосоме может потребовать некоторого времени в отсутствие взаимодействия со следующим участком синтезируемого полипептида. Пауза после завершения синтеза структурно автономной или полуавтономной части белка обеспечивает задержку синтеза следующей части несвернутой цепи и соответственно предоставляет время, необходимое для беспрепятственного самосворачивания завершенной части на рибосоме. Задержка на границе доменов при синтезе многодоменных белков неоднократно обсуждалась в литературе. Паузы в процессе элонгации белка D1 реакционного центра хлоропластов — прекрасный пример связи между участками пауз на цепи белка, с одной стороны, и стадиями котрансляционного связывания кофакторов (таких как хлорофилл) с белком D1 и котрансляционного встраивания белка в тилакоидную мембрану, с другой стороны (Муллет и др., 1991).

Другая роль трансляционных пауз на специфических участках цепи мРНК может заключаться в обеспечении мишеней для регуляции синтеза белка на уровне элонгации. Прежде всего, временные остановки могут быть регулируемы, и поэтому общая продукция белка может быть модулируема с помощью удлинения или укорочения паузы (см. подразд. 12.3). Кроме того, как отмечалось ранее, паузы во время элонгации могут стимулировать сдвиг рамки на участке задержки (см. подразд. 11.4.2).

Ниже обсуждаются три различных механизма, которые могут приводить к неравномерной трансляции (трансляционным паузам).

12.2.2. Модулирующие кодоны

Наиболее часто предлагаемое объяснение рибосомных пауз — недостаток определенных аминоксил-тРНК, который может задерживать движение рибосомы на соответствующих кодонах. Другими словами, транслирующая рибосома может задерживаться на кодонах, соответствующих минорным (присутствующим в малых количествах) изоакцепторным тРНК. Анализ частот использования различных кодонов в мРНК показывает, что в мРНК, кодирующих «мажорные» клеточные белки (т.е. белки, синтезируемые в больших количествах), избирательно используются те синонимные кодоны, которые соответствуют изоакцепторным тРНК, присутствующим в клетке в относительно больших количествах (Икемура, 1981). Синонимные кодоны, соответствующие минорным тРНК (т.е. изоакцепторным тРНК, присутствующим в малых количествах), в этих мРНК использу-

ются редко, если вообще используются. Очень редко используются кодонами в *E. coli* являются аргининовые кодоны CGA и CGG, а также AGA и AGG, лейциновый кодон AUA, лейциновый кодон CUA и пролиновый кодон CCC. Сериновые кодоны UCA и UCG, глициновые кодоны GGA и GGG, лейциновые кодоны UUA и UUG, CUU и CUC; пролиновый кодон CCU, треониновые кодоны ACA и ACG и сериновый кодон AGU могут быть квалифицированы как относительно редкие кодоны. Когда транслирующая рибосома сталкивается с таким редким кодоном в мРНК, ей необходимо какое-то время для ожидания прихода редкой (минорной) тРНК из окружающей среды. Другими словами, низкие концентрации некоторых тРНК могут быть фактором, ограничивающим скорость трансляции, что приводит к трансляционным паузам на соответствующих редких кодонах.

Редкие кодоны, соответствующие минорным тРНК, можно назвать *модулирующими кодонами*, так как предполагается, что они играют модулирующую роль, т.е. регулируют скорость трансляции (Грожан и Фирс, 1982). Чем больше модулирующих кодонов встречается в данной мРНК, тем слабее ее экспрессия. В то же время клетка может избирательно менять степень экспрессии (транслируемости) слабо экспрессируемой мРНК путем *адаптации* концентрации изоакцепторных тРНК к набору кодонов в данной мРНК (Ельская и др., 1971; Гарел, 1976; см. также обзор: Candelas, G. C., et al., 1987). Например, известно, что во время интенсивного синтеза фиброина в шелкоотделительных железах *Bombyx mori* внутриклеточный набор изоакцепторных тРНК претерпевает сильные изменения, в результате которых увеличивается количество тРНК, необходимых для трансляции мРНК этого белка; в частности, определенные глициновая, аланиновая и сериновая изоакцепторные тРНК становятся преобладающими в согласии с преобладанием соответствующих глициновых, аланиновых и сериновых кодонов в мРНК фиброина.

Использование мРНК фиброина шелка как матрицы в гетерологичной бесклеточной системе трансляции (ретикулоцитов кролика) продемонстрировало эффект влияния набора тРНК на рибосомные паузы: было обнаружено, что транслирующая рибосома приостанавливает элонгацию в определенных точках, и полноразмерный белковый продукт может быть получен только при добавлении тРНК шелкоотделительных желез *Bombyx mori* (Шаванси и др., 1981). Поскольку в шелкоотделительных железах наблюдается соответствие между внутриклеточным уровнем различных тРНК и аминокислотным составом фиброина, так же как между распределением изоакцепторных тРНК и частотой встречаемости соответствующих синонимных кодонов в мРНК фиброина, ограничение по некоторым аминоацил-тРНК, когда используется гетерологичная тРНК, является наиболее очевидной причиной рибосомных пауз.

Однако в ряде экспериментов как *in vivo*, так и *in vitro* было показано, что единичные редкие кодоны в цепи мРНК во многих случаях не приводят к значительным паузам в трансляции. Чаще всего сильный эффект остановки или паузы достигается в случаях, когда на пути рибосомы встречаются тандемы редких кодонов — особенно, когда два или более редких кодона подряд должны узнаваться одной и той же минорной тРНК. Это легко объяснимо: первый редкий кодон связывает «свою» минорную аминоацил-тРНК в *A*-участке рибосомы, и затем этот кодон вместе с тРНК транслируется в *P*-участок, так что рибосома уводит эту, и так редкую, аминоацил-тРНК из своего непосредственного окружения; опустевший *A*-участок с очередным редким кодоном вынужден ждать еще более

редкого шанса случайного подхода такой же аминокацил-тРНК. Получается длинная пауза в элонгации.

12.2.3. Структурные барьеры на мРНК

Скорость продвижения рибосомы по цепи мРНК может быть неодинаковой также и из-за разницы в стабильности вторичных и третичных структур различных участков матрицы. В частности, чтобы иметь стабильный двухтяжевый участок мРНК в расплетенном и доступном для трансляции виде, рибосоме необходимо большее время «ожидания», чем при трансляции других, менее структурированных участков мРНК. В таких случаях возникает неравномерность в элонгации; места трансляционных пауз соответствуют прохождению рибосомой стабильных двойных спиралей, псевдоузлов, третичных взаимодействий и т.д. Такая возможность согласуется с предсказаниями вторичных структур на мРНК, кодирующих некоторые неравномерно синтезируемые белки (Чейни и Моррис, 1979).

В связи с рассматриваемой гипотезой особый интерес представляет наблюдение, сделанное Свиткиным и Аголом (1983). Они показали, что во время трансляции мРНК вируса энцефаломиокардита в определенном ее участке существует трансляционный барьер, вызывающий значительную задержку во времени экспрессии следующей кодирующей последовательности. Примечательно, что этот барьер преодолевается добавлением eEF2 в количествах, превышающих каталитические количества этого белка, необходимые для максимальных скоростей элонгации на других участках мРНК. Следовательно, избыток eEF2 может играть регуляторную роль в элонгации: он может приводить к дестабилизации некоторых структурных барьеров в мРНК, таких как стабильные спирали или специфические третичные взаимодействия. Молекулярный механизм описанного эффекта не известен.

В случае трансляции мРНК глобина было обнаружено, что распределение пауз не зависит ни от концентраций тРНК, ни от концентраций факторов элонгации. Однотипный характер пауз на глобиновой мРНК был продемонстрирован и в интактных ретикулоцитах кролика, и в ретикулоцитной бесклеточной системе трансляции, и в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы. На основании этих результатов было сделано заключение, что паузы в трансляции в данном случае вызывает главным образом вторичная структура мРНК (Протцел и Моррис, 1974; Чейни и Моррис, 1979).

На скорость элонгации могут влиять не только вторичная и третичная структуры мРНК сами по себе (например, шпильки или псевдоузлы), но и связанные с мРНК белки, которые способны затруднять элонгацию на специфических участках как непосредственно, так и путем стабилизации локальной вторичной или третичной структуры мРНК.

12.2.4. Новосинтезируемые пептиды, ингибирующие рибосому

Возможность ингибиторного действия синтезируемых пептидов на элонгацию была продемонстрирована довольно давно, в экспериментах с использованием поли(А) как матрицы для рибосомного синтеза полилизина в бескле-

точной системе. После того как пептид достигал длины 6—7 остатков лизина, рибосома приостанавливала элонгацию независимо от длины поли(А) матрицы (Пулкрабек и Рыхлик, 1968). Следовательно, появление олиголизинового участка данной длины в пептидилтрансферазном центре рибосомы приводит к ее остановке. Похоже, что этот эффект достигается вследствие взаимодействия поликатионного тяжа олиголизина с 23S рРНК в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ).

Позднее были найдены природные неосновные олигопептидные последовательности, синтез которых приводил к остановке рибосомы, их синтезировавшей. Например, синтез пентапептида Met-Val-Lys-Thr-Asp или октапептида Met-Ser-Thr-Ser-Lys-Asn-Ala-Asp в клетках *E. coli* приводит к прерыванию последующей элонгации (Гу и др., 1994). Было показано, что пептиды с такими последовательностями специфически взаимодействуют с участками рРНК в ПТЦ синтезировавшей их рибосомы. Считается, что появление таких ингибиторных пептидных последовательностей («эффекторных мотивов») во время элонгации может быть причиной некоторых трансляционных пауз.

Особый интерес представляют случаи, когда остановка элонгации растущим пептидом зависит от того или иного низкомолекулярного лиганда (см. обзор: Tenson, T., and Ehrenberg, M., 2002). Например, известна эволюционно консервативная последовательность регуляторного пептида *AAP* грибов, наличие которой в растущем полипептиде останавливает элонгирующую рибосому в присутствии аргинина, причем независимо от положения *AAP* в цепи растущего полипептида и от вида эукариотических рибосом, на которых осуществляется трансляция — грибных, растительных или животных (Фанг, Сакс и др., 2004).

В эукариотических системах трансляционные паузы иногда наблюдаются как результат выхода из ПТЦ рибосомы довольно длинной полипептидной последовательности, по-видимому, формирующей определенную пространственную структуру. Например, такая пауза на 75-м аминокислотном остатке (глициновый кодон GGC) происходит во время синтеза препролактинина быка в бесклеточных системах трансляции ретикулоцитов кролика и проростков пшеницы (Уолин и Вальтер, 1988). Ни ограничения по аминокислотам, ни структурные барьеры мРНК не играют роли в задержке трансляции в данном случае; наиболее вероятная причина паузы — структура новосинтезированного полипептида.

Кроме прямого эффекта синтезируемого полипептида на рибосому, возможно существование регуляторных белков или малых рибонуклеопротеидов, которые взаимодействуют с синтезируемым полипептидом или транслирующей рибосомой и избирательно останавливают или затрудняют элонгацию в определенных местах. Известен пример таких специфических репрессоров элонгации у эукариот: это рибонуклеопротеидная частица, содержащая 7S РНК, — так называемая SRP-частица (*Signal Recognition Particle*, «сигналузнающая частица»), которая узнает особую N-концевую (лидерную) гидрофобную последовательность образующегося полипептида на транслирующей рибосоме, присоединяется к рибосоме и приостанавливает дальнейшую элонгацию до тех пор, пока рибосома не вступит во взаимодействие с мембраной эндоплазматического ретикула (см. подразд. 17.2). Нельзя исключить, что подобные механизмы используются для регуляции скорости элонгации на других этапах синтеза белка, например на определенных стадиях сворачивания или сборки белка на транслирующей рибосоме.

12.3. Избирательная регуляция скорости элонгации на специфических мРНК

У эукариот во время развития клеток и организмов, а также в ответ на обработку гормонами или под действием факторов окружающей среды возможны дифференциальные изменения скоростей элонгации на различных мРНК. Один из примеров — различная скорость элонгации на двух популяциях мРНК после теплового шока в клетках *Drosophila*: элонгация на основных дошоковых мРНК сильно замедляется и в то же время оказывается быстрой на мРНК, синтезированных в результате теплового шока (Баллингер и Пардью, 1983). Во время теплового шока ретикулоцитов цыпленка синтез белка теплового шока с молекулярным весом 70 кДа (HSP70), но не глобина, возрастает в несколько раз из-за специфического увеличения скорости элонгации образующегося пептида HSP70 (Теодоракис и др., 1988).

Другой пример регулируемых дифференциальных изменений в скорости элонгации был продемонстрирован Герке, Баст и Иланом (1981): эстроген, введенный цыплятам, вызывает индуцирование синтеза вителлогенина в печени с начальной скоростью элонгации около 9 остатков в секунду; в то же время скорость элонгации суммарных белков печени снижается с 7 до 4,5 остатков в секунду, а для сывороточного альбумина составляет всего 2 аминокислоты в секунду. Весьма селективный эффект наблюдался в культуре клеток гепатомы: при обработке дибутирилциклическим АМФ скорость элонгации суммарных белков не изменялась (около 2 остатков в секунду), но значительно увеличивалась скорость элонгации тирозинаминотрансферазы (до 10 остатков в секунду). Было также показано, что при употреблении крысами пищи, содержащей большое количество белка, скорость элонгации орнитинаминотрансферазы в печени увеличивалась, в то время как скорость элонгации тотальных белков печени немного уменьшалась.

Таким образом, имеют место дифференциальные эффекты на трансляцию кодирующих последовательностей различных мРНК, и специфические мРНК могут быть подвергнуты избирательной регуляции. В некоторых случаях в одной и той же клетке на разных мРНК эффекты могут быть совершенно противоположными.

Механизмы избирательной регуляции скорости элонгации на различных эукариотических мРНК не известны. Вероятно число и продолжительность рибосомных пауз различаются для разных мРНК, и некоторые остановки могут быть более чувствительными к регуляции, чем другие. Возможные изменения в популяции изоакцепторных тРНК, а также изменения в концентрациях факторов элонгации и аминоацил-тРНК-синтетаз могут влиять на избирательную регуляцию элонгации, в частности путем регуляции продолжительности пауз. Нельзя исключать и прямого участия гипотетических репрессоров элонгации, например, белков, способных связываться с определенными кодирующими отрезками мРНК.

Другая возможность состоит в том, что различные мРНК, тРНК, факторы элонгации, аминоацил-тРНК-синтетазы и РНК-связывающие белки могут быть распределены в клетке неравномерно. В качестве примеров могут быть рассмотрены случаи запрограммированного специфического распределения некоторых мРНК в ооцитах и мРНК, кодирующих белки цитоскелета, в фибробластах. Также существуют экспериментальные доказательства неравномерного распределения факторов элонгации и аминоацил-тРНК-синтетаз в цитоплазме эукариотических

клеток (см. обзор: Ryazanov, A. G., et al., 1987). Эти белки обладают родством с полирибосомам и компарментализуются на них. Факты динамической компарментализации мРНК, факторов элонгации и аминоацил-тРНК-синтетаз на полирибосомах подтверждают возможность существования такой ситуации, когда некоторые полирибосомы, вместе со связанными с ними белками трансляционного аппарата, физически отделены от других полирибосом в той же самой клетке, обеспечивая механизм дифференциальной регуляции скорости элонгации на различных мРНК.

12.4. Тотальная регуляция элонгации

12.4.1. Общие изменения скорости элонгации

В некоторые критические моменты жизни эукариотической клетки скорость элонгации полипептидной цепи, т.е. скорость движения рибосомы вдоль цепи мРНК, может увеличиваться или уменьшаться на всех транслируемых клеточных мРНК одновременно. К таким моментам относится оплодотворение, митоз, переход из состояния покоя к пролиферации и обратно, поворотные моменты клеточной дифференцировки, функциональная активация дифференцирующихся клеток, вирусная инфекция, клеточная смерть и т.п.

Феномен тотальной регуляции элонгации иллюстрируется многими работами, в которых производилось измерение скорости элонгации тотальных мРНК (см. обзор: Spirin, A. S., and Ryazanov, A. G., 1991). Например, было показано, что при оплодотворении яиц морского ежа происходит двукратное увеличение общей скорости элонгации. Сильное ингибирование синтеза белка вызывается, по крайней мере, частично, замедлением элонгации в анафазе, которое сопровождается образованием крупных полирибосом. Классическим примером тотального ускорения элонгации является случай стимуляции культур клеток млекопитающих сывороткой крови. Было также показано четырехкратное увеличение скорости элонгации при образовании мицелия у гриба *Mucor racemosus*. После теплового шока в культуре клеток тканей *Drosophila* скорость элонгации большинства мРНК понижается. Под влиянием глюкагона в печени крысы происходит временное тотальное замедление элонгации. Введение эстрадиола цыплятам индуцировало снижение скорости элонгации практически на всех мРНК клеток печени.

Вирусные инфекции эукариотических клеток также могут приводить к снижению скорости элонгации всех полипептидов, синтезирующихся в клетке. Общее замедление элонгации особенно характерно для пикорнавирусных инфекций; его наблюдали в клетках HeLa, инфицированных полиовирусом, мышинных клетках асцитного рака Эрлиха, зараженных менговирусом, L-клетках, инфицированных вирусом энцефаломиокардита. Ингибирование элонгации также происходит в клетках, зараженных вирусом коровьей оспы, и этот эффект может быть воспроизведен *in vitro*, в бесклеточной системе, при добавлении коровых частиц вируса. Данное наблюдение подтверждает прямой эффект вирусных компонентов на какое-то звено элонгационного цикла.

Необходимо отметить, что скорость элонгации в целом может регулироваться неспецифическими факторами, такими как внутриклеточная ионная сила, pH и температура. В частности, было обнаружено, что концентрация ионов K^+ важна

именно для элонгации: уменьшение концентрации K^+ ингибирует преимущественно элонгацию, но не инициацию, в ретикулоцитных клетках и клеточных экстрактах. Повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} в эукариотических клетках, среди некоторых других эффектов, также приводит и к замедлению элонгации. Уменьшение pH с 7,5 до 7,0 ведет к значительному уменьшению скорости элонгации. Во всех случаях элонгация сильно зависит от температуры.

Имеются все основания полагать, что в большинстве описанных случаев скорость эукариотической элонгации регулируется путем изменения активности факторов элонгации.

12.4.2. Фосфорилирование фактора элонгации 2

В различных экстрактах тканей млекопитающих, например в экстрактах ретикулоцитов кролика или печени крысы, eEF2 является основным фосфорилируемым белком (Рязанов, 1987; см. также обзор: Ryazanov, A. G., et al., 1988). Фосфорилирование этого белка катализируется специфической Ca^{2+} /кальмодулинзависимой протеинкиназой, которая называется eEF2-киназой. Этот белок представляет собой мономер с молекулярной массой около 100 кДа. Он был обнаружен практически во всех клетках и тканях млекопитающих, в которых происходит синтез белка, а также в клетках многих беспозвоночных. eEF2-киназа принадлежит к семейству альфа-киназ. Единственным известным субстратом для этой киназы служит eEF2; eEF2-киназа фосфорилирует остатки треонина в N-концевой части eEF2. Первичный участок фосфорилирования eEF2 *in vivo* — остаток Thr56; два других близко расположенных остатка треонина, Thr58 и, в меньшей степени, Thr53 также могут быть фосфорилированы, особенно *in vitro*.

Фосфорилирование eEF2 делает его неспособным принимать участие в белковом синтезе. В экспериментах с синтетическими и природными матрицами было показано, что скорость элонгации прямо связана с количеством нефосфорилированного eEF2. Протеинфосфатаза типа 2А дефосфорилирует белок eEF2 и соответственно реактивирует его. Таким образом, количество нефосфорилированного eEF2 зависит от баланса активности eEF2-киназы и фосфатазы типа 2А в клетке или в клеточном экстракте. Окадаевая кислота ингибирует фосфатазу и, таким образом, вызывает увеличение содержания фосфорилированной неактивной формы eEF2, что выражается в ингибировании элонгации. Кроме ионов кальция важную роль в активации eEF2-киназы играет понижение внутриклеточного pH. Активность eEF2-киназы также регулируется другими протеинкиназами. Например, киназа рибосомного белка S6 (S6K1) фосфорилирует и инактивирует eEF2-киназу, а АМФ-активируемая протеинкиназа, наоборот, активирует eEF2-киназу.

Фосфорилирование всего лишь одного аминокислотного остатка eEF2, а именно Thr56, является достаточным для инактивации белка. Этот остаток треонина расположен в так называемой «эффекторной петле» белка eEF2 (см. подразд. 11.2.1), которая участвует во взаимодействии белка с рибосомой. В то же время было обнаружено, что фосфорилированная форма белка eEF2 может образовывать комплексы с ГТФ и с рибосомой, но не способна катализировать реакцию транслокации. Возможны два объяснения этого факта: либо связывание фосфорилированного eEF2 с рибосомой не достаточно сильно для индукции транслокации (действительно, это взаимодействие слабее, чем в случае нефосфорилиро-

ванной формы белка), либо такое связывание происходит топографически некорректно (фосфорилированный фактор неправильно садится на рибосому).

Вопрос о роли фосфорилирования eEF2 *in vivo* долгое время оставался открытым. Недавно было показано, что фосфорилирование eEF2 eEF2-киназой играет ключевую роль в регуляции запрограммированной клеточной смерти — апоптоза (Бойс, Рязанов и др., 2008). Оказалось, что *in vivo* заметное фосфорилирование eEF2 происходит только в клетках, находящихся в процессе апоптоза. Предполагается, что фосфорилирование eEF2 приводит к ингибированию синтеза белка и, вследствие этого, падению уровня короткоживущих белков-ингибиторов апоптоза. Было показано, что нокаутирование гена eEF2-киназы повышает устойчивость мышинных клеток к различным факторам, вызывающим апоптоз. Интересно, что мыши, нокаутированные по гену eEF2-киназы, обладают повышенной устойчивостью к радиации, а также увеличенной продолжительностью жизни.

12.4.3. Модификации фактора элонгации 1

Ряд наблюдений указывает на то, что активность eEF1 может меняться в зависимости от условий культивирования, действия гормонов и возраста клеток. Было показано, что общая скорость синтеза белка коррелирует с активностью eEF1. Такая зависимость наблюдалась у культур клеток млекопитающих, стимулированных сывороткой, регенерирующих тканей, клеток селезенки во время иммунного ответа, яиц морского ежа после оплодотворения, прорастающих спор грибов, а также у клеток и органов млекопитающих и насекомых в процессе старения (см. обзор: Spirin, A. S., and Ryazanov, A. G., 1991). Однако, несмотря на все эти указания на роль eEF1 в регуляции скорости элонгации, природа модификаций этого белка, ответственных за изменения его активности, до сих пор не определена.

Говоря об уже известных типах ковалентных модификаций белка eEF1, необходимо упомянуть о характерном для этого белка метилировании нескольких остатков лизина. У гриба *Mucor racemosus* повышение уровня метилирования eEF1 α коррелирует с увеличением общей скорости элонгации при образовании мицелия, а понижение уровня метилирования сопровождается уменьшением активности eEF1 в процессе прорастания спор. Также было продемонстрировано фосфорилирование белка eEF1 как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако прямой зависимости активности фактора и скорости элонгации от фосфорилирования в экспериментах не обнаружено. Наконец, было показано, что eEF1A из различных клеток и тканей млекопитающих подвергается этаноламинированию по двум специфическим остаткам глутаминовой кислоты. Влияние этой ковалентной модификации на функцию белка также остается неизвестным. Таким образом, хотя имеются указания на возможное участие белка eEF1 в регуляции скорости элонгации и показаны некоторые ковалентные модификации eEF1, не существует убедительных объяснений, проливающих свет на взаимоотношения между этими процессами.

12.5. Белковые токсины, воздействующие на элонгацию

Некоторые белковые токсины бактериального, грибного и растительного происхождения оказались сильными ингибиторами эукариотических систем синте-

за белка. Эти токсины блокируют фазу элонгации трансляции. Все они имеют каталитический (ферментативный) механизм действия. Их мишенями служат либо eEF2, либо факторсвязывающий участок эукариотических рибосом.

12.5.1. Дифтерийный токсин

Дифтерийный токсин — белок с молекулярной массой около 60 кДа (см. обзоры: Collier, R.J., 1975; Pappenheimer, A. M., 1977; Heyningen, van S., 1980). Он секретируется клетками *Corynebacterium diphtheriae*, содержащими геном лизогенного бактериофага β ; таким образом, этот белок является продуктом фагового, а не собственно бактериального генома. Молекула белка представляет собой одну ковалентно непрерывную полипептидную цепь, организованную в два относительно независимых друг от друга глобулярных домена (А и В). Между доменами имеется скрепляющий их дисульфидный мостик. С-концевой домен В, имеющий молекулярную массу около 39 кДа, способен специфически связываться с поверхностными белками животной клетки. Связывание белка с поверхностью клетки приводит к следующей цепи событий. Белок входит в цитоплазматическую мембрану, и затем междоменная пептидная связь протеолитически разрезается, что сопровождается также и восстановлением дисульфидного мостика. В результате образуются два фрагмента: А и В. N-концевой фрагмент А, имеющий молекулярную массу 21 150 Да, входит в цитоплазму. Именно этот фрагмент служит ингибитором синтеза белка в клетке. Он оказался высокоспецифичным ферментом, осуществляющим АДФ-рибозилирование всего лишь одного аминокислотного остатка в белке eEF2. Такая модификация нарушает нормальное функционирование eEF2. Поскольку действие фрагмента А носит каталитический характер, одной молекулы токсина достаточно для того, чтобы модифицировать все молекулы eEF2 и, таким образом, убить клетку.

Необходимо отметить, что исходные молекулы дифтерийного токсина не обладают таким ингибиторным действием на белковый синтез; изначальный токсин скорее можно считать зимогеном, превращаемым в каталитически активный белок (фрагмент А) только после расщепления. С другой стороны, сам по себе фрагмент А не обладает цитотоксическим действием, так как не может проникнуть в интактную клетку.

Субстратом, от которого остаток АДФ-рибозы ферментативно переносится на eEF2, является никотинамидадениндинуклеотид (НАД):



Эта реакция обратима, *in vitro* в условиях избытка никотинамида можно де-АДФ-рибозилировать белок и, таким образом, восстановить интактный eEF2.

Аминокислотный остаток в eEF2, на который переносится АДФ-рибоза, представляет собой уникальное производное пеницилина — так называемый дифтаמיד (рис. 12.3). АДФ-рибозильный остаток переносится на азот имидазольного кольца, отмеченный на рисунке стрелкой. Остаток дифтамида в eEF2 аналогичен остатку His573 в бактериальном белке EF-G, который расположен на верхушке тРНК-подобного домена IV, в петле, соединяющей β -тяж 7 с α -спиралью В (см. рис. 11.2). Естественно, появление массивной заряженной группы АДФ-рибозилированного остатка дифтамида в таком важном участке eEF2, который должен взаимодействовать с А-участком малой рибосомной субъединицы, не может не сказаться на функции белка.

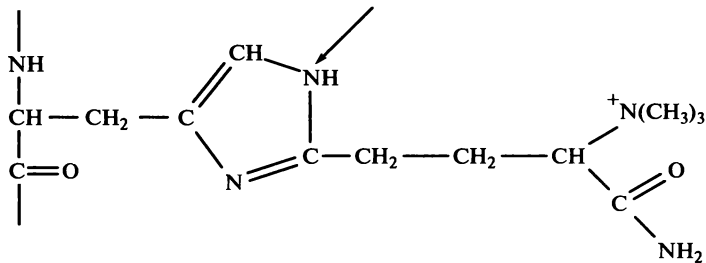


Рис. 12.3. Остаток дифтамида в эукариотическом факторе элонгации eEF2 (в положении, эквивалентном His573 домена IV бактериального фактора элонгации EF-G).

Стрелка указывает место АДФ-рибозилирования.

Van Heyningen (1980) In *The Enzymology of Post-Translational Modification of Proteins* (Freedman and Hawkins, eds.), 1, pp. 387—422. Academic Press, London

Однако конкретный механизм ингибирования синтеза белка, происходящего в результате АДФ-рибозилирования остатка дифтамида, остается во многом неясным. После АДФ-рибозилирования eEF2 по-прежнему способен взаимодействовать с ГТФ как с эффектором, и комплекс АДФ-рибозо-eEF2 с ГТФ связывается с рибосомой. Связывание происходит в том же самом факторсвязывающем участке на большой рибосомной субъединице, что и в случае немодифицированного eEF2. Взаимодействие модифицированного фактора и ГТФ с рибосомой сопровождается проявлением ГТФазной активности. В то же время было показано, что в случае АДФ-рибозилированного eEF2 сродство фактора к рибосоме в претранслокационном состоянии понижается. Возможно, рассматриваемая модификация «выключает» домен IV белка eEF2: этот тРНК-подобный домен становится неспособным к нормальному взаимодействию с А-участком малой рибосомной субъединицы. Можно ожидать по крайней мере двух последствий этого факта: во-первых, общее сродство eEF2 к рибосоме снижается; во-вторых, катализ транслокации может стать неэффективным, в частности, из-за обратимости перемещения остатка тРНК, подвергающегося транслокации, между промежуточным и претранслокационным состоянием (возвращение в свободный А-участок).

Экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* обладает механизмом действия, подобным дифтерийному токсину. Этот белок, имеющий молекулярную массу 71,5 кДа, также взаимодействует с поверхностью клетки своим доменом В. После того как белок погружается в мембрану, он разрезается на два фрагмента (А и В) с молекулярными массами 27 и 45 кДа соответственно; затем фрагмент А проникает в цитоплазму. Этот фрагмент представляет собой фермент, переносящий АДФ-рибозный остаток от НАД на тот же самый остаток дифтамида в eEF2, что ведет к ингибированию синтеза белка. Однако никакого иммунологического перекреста между описываемым токсином и дифтерийным токсином не наблюдается, да и рецепторы этих двух токсинов на клеточной мембране различны.

12.5.2. Шига-токсин

Токсин, вырабатываемый *Shigella dysenteriae*, также является мощным ингибитором белкового синтеза в клетках позвоночных животных. Этот белковый

токсин состоит из одной полипептидной цепи А с молекулярной массой 30,5 кДа и пяти относительно коротких В-цепей в β -конформации с молекулярной массой около 5 кДа каждая (A₁, B₅). В-часть белка, по-видимому, ответственна за взаимодействие токсина с рецептором цитоплазматической мембраны животной клетки и последующее погружение в мембрану. Протеолитическое расщепление А-цепи токсина в мембране приводит к образованию двух фрагментов — А1 (молекулярная масса 27,5 кДа) и А2 (молекулярная масса 3 кДа); фрагмент А1 проникает в цитоплазму и ингибирует синтез белка. Ингибирование — результат проявления ферментативной активности фрагмента А1 (необходимо отметить, что до расщепления ферментативная активность не проявляется). Мишенью ферментативного действия в данном случае служит 60S субъединица эукариотической 80S рибосомы. Показано, что фрагмент А1 является гликозидазой, специфически гидролизующей N-гликозидную связь остатка аденозина в позиции 4324 в 28S рРНК млекопитающих (аналог А2660 в 23S рРНК *E. coli*; см. подразд. 8.4 и рис. 8.10) (Эндо и др., 1988). Рибосомы с модифицированной таким образом 60S субъединицей способны осуществлять транспептидацию; иными словами, пептидилтрансферазный центр не повреждается токсином. Ингибирование синтеза белка фрагментом А1 происходит вследствие разрушения фактoрcвязывающего участка 60S рибосомной субъединицы. Таким образом, оказываются нарушенными как функция eEF1 (связывание аминоксил-тРНК), так и функция eEF2 (транслокация) (Обриг и др., 1987; Фурутани и др., 1992).

Интересно, что шига-подобные токсины, называемые также токсинами Веро (VТ1 и VТ2), образуются в результате жизнедеятельности некоторых патогенных штаммов *E. coli*. Структура этих токсинов очень близка к структуре шига-токсина, и механизм их действия, по-видимому, такой же.

12.5.3. Альфа-сарцин

α -Сарцин продуцируется плесневым грибом *Aspergillus giganteus*. Это небольшой основной белок с молекулярной массой около 16 кДа. Белок является исключительно мощным ингибитором синтеза белка в эукариотических клетках и клеточных экстрактах. Он представляет собой высокоспецифичную эндонуклеазу: ингибирование трансляции обусловлено гидролизом единственной фосфодиэфирной связи на 3'-стороне G4325 в 28S рРНК млекопитающих (аналог G2661 в 23S рРНК *E. coli*; см. рис. 8.10) (Эндо и Вул, 1982). Так как мишень — консервативная спиральная структура в домене VI 28S рРНК — вовлечена в формирование фактoрcвязывающего участка 60S рибосомной субъединицы (см. подразд. 8.4), взаимодействия обоих фактoрoв элонгации, eEF1 и eEF2, с рибосомой в результате действия токсина оказываются нарушенными. Доминирующим эффектом, наблюдавшимся в экспериментах, было ингибирование связывания комплекса Aа-tRNA•eEF1•GTP с рибосомой.

12.5.4. Растительные белковые токсины

Среди растительных лектинов, специфически связывающихся с D-галактозными остатками гликопротеидов клеточной мембраны животной клетки, имеется ряд сильных токсинов, ингибирующих синтез белка в клетках-мишенях. Эта

группа токсинов включает рицин из клещевины (*Ricinus communis*), абрин из абруса (*Abrus precatorius*), модекцин из адении (*Modecca digitata*), вискумин из омелы белой (*Viscum album*) (см. обзоры: Olsnes, S., and Pihl, A., 1982). Перечисленные белки обнаруживают поразительное сходство с бактериальными токсинами в отношении их молекулярно-функциональной организации.

Рицин представляет собой двухсубъединичный белок (гликопротеид) с молекулярной массой 62 кДа. В-субъединица (молекулярной массой 31,4 кДа) является собственно лектином и способна специфически связываться с галактозными остатками на внешней стороне мембраны животной клетки. А-субъединица (молекулярной массой 30 кДа) ответственна за ингибирование белкового синтеза в цитоплазме. Две субъединицы скреплены вместе дисульфидным мостиком. Закрепление токсина на мембране ведет к его погружению в нее, восстановлению дисульфидной связи и вхождению освобожденной А-субъединицы в цитоплазму. А-субъединица обладает специфической N-гликозидазной активностью: она депурирует остаток аденозина в позиции 4324 в домене VI 28S рРНК млекопитающих (аналог А2660 в 23S рРНК *E. coli*, см. рис. 8.10) (Эндо и др., 1987). Эта модификация ведет к нарушению функции факторсвязывающего участка 60S рибосомной субъединицы. Соответственно связывание как комплекса Аа-tRNA•eEF1•GTP, так и комплекса eEF2•GTP нарушается при действии рицина. Ухудшение связывания eEF1 с рибосомой более заметно *in vitro* (в экспериментальных условиях).

Другие растительные токсины организованы и действуют подобным же образом, хотя как химически, так и структурно могут сильно различаться. Особого упоминания заслуживает так называемый «антивирусный белок лаконоса» (*PAP, Pokeweed Anti-viral Protein*) из *Phytalacca americana*. Его молекулярная масса около 27 кДа, и он представляет собой аналог А-субъединицы рицина. Соответственно он не обладает лектиновой активностью и не способен взаимодействовать с клеточной мембраной. Поэтому белок PAP не действует на интактные клетки, но сильно ингибирует синтез белка *in vitro*, в эукариотических бесклеточных системах, вследствие специфической N-гликозидазной активности.

12.5.5. Искусственные химерные токсины

Таким образом, разнообразные белковые токсины бактериального и растительного происхождения используют один и тот же принцип цитотоксического действия, основанный на двухсубъединичном (или двухдоменном) принципе строения белка: одна субъединица (или домен) взаимодействует с мембраной и ответственна за трансмембранный транспорт, а другая проникает внутрь клетки и проявляет там ферментативную активность, приводящую к ингибирующей модификации компонента системы синтеза белка. Можно воспользоваться этим принципом живой природы для доставки внутрь клетки любого белка с ферментативной функцией, искусственно сшив (конъюгировав) его с другим подходящим белком, способным взаимодействовать с мембраной (см. обзоры: Olsnes, S., and Pihl, A., 1982). Например, используя простую процедуру дисульфидного обмена, оказалось возможным сшивать ферментативный фрагмент А дифтерийного токсина или А-субъединицу рицина с нетоксическим растительным лектином (например, с конканавалином А или лектином из *Wistaria floribunda*) и получать цитотоксический эффект. Очевидно, что в таком случае лектиновая часть химер-

ного белка ответственного за доставку ингибиторного компонента в клетку, но, как и в случае исходных токсинов, эффект не является тканеспецифичным.

Высокую тканеспецифичность химерного белка удается получать, сшивая фрагмент А дифтерийного токсина или А-субъединицу рицина с тем или иным пептидным гормоном, взаимодействующим со специфическим рецептором мембраны клеток определенного типа (например, с хорионмическим гонадотропином, эпидермальным фактором роста или инсулином). В этих случаях ферментативный компонент также доставляется внутрь клетки и, ингибируя синтез белка, убивает ее. Более того, компонентом, взаимодействующим с мембраной, может служить антитело (или его Fab-фрагмент) против какого-либо поверхностного антигена, специфичного только для мембран данного типа клеток. Тогда, сшивая фрагмент А дифтерийного токсина или А-субъединицу рицина с таким антителом, можно получить крайне специфичный химерный токсин, избирательно убивающий лишь клетки данного типа. Если в качестве компонента такого димерного токсина, связывающегося с мембраной, использовать антитело против поверхностного антигена опухолевой клетки, токсин может избирательно убивать только клетки опухоли, не оказывая эффекта на другие клетки.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 12

- Ballinger, D. G., and Pardue, M. L. (1983). The control of protein synthesis during heat shock in *Drosophila* cells involves altered polypeptide elongation rates. *Cell* **33**: 103—114.
- Boyce, M., Py, B. F., Ryazanov, A. G., Minden, J. S., Long, K., Ma, D., and Yuan, J. (2008). A pharmacoproteomic approach implicates eukaryotic elongation factor 2 kinase in ER stress-induced cell death. *Cell Death and Differentiation* **15**: 589—599.
- Chaney, W. G., and Morris, A. J. (1979). Nonuniform size distribution of nascent peptides. The effect of messenger RNA structure upon the rate of translation. *Arch. Biochem. Biophys.* **194**: 283—291.
- Chavancy, G., Marbaix, G, Huez, G., and Cleuter, Y. (1981). Effect of tRNA pool balance on rate and uniformity of elongation during translation of fibroin mRNA in a reticulocyte cell-free system. *Biochimie* **63**: 611—618.
- Elska, A., Matsuka, G., Matiash, U., Nasarenko, I., and Semenova, N. (1971). tRNA and aminoacyl-tRNA synthetases during differentiation and various functional states of the mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **247**: 430—440.
- Endo, Y., and Wool, I. (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence of the alpha-sarcin cleavage site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **257**: 9054—9060.
- Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M., and Tsurugi, K. (1987). The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* **262**: 5908—5912.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., and Igarashi, K. (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* 0157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **171**: 45—50.
- Fang, P., Spevak, C., Wu, C., and Sachs, M. S. (2004). A nascent polypeptide domain that can regulate translation elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4059—4064.
- Furutani, M., Kashiwagi, K., Ito, K., Endo, Y., & Igarashi, K. (1992). Comparison of the modes of action of a Vero toxin (a Shiga-like toxin) from *Escherichia coli*, of ricin, and of alpha-sarcin. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**: 140—146.
- Garel, J.-P. (1976). Quantitative adaptation of isoacceptor tRNAs to mRNA codons of alanine, glycine, and serine. *Nature* **260**: 805—806.

- Gehrke, L., Bast, R. E., and Ilan, J. (1981). An analysis of rates of polypeptide chain elongation in avian liver explants following *in vivo* estrogen treatment. II. Determination of the specific rates of elongation of serum albumin and vitellogenin nascent chains. *J. Biol. Chem.* **256**: 2522—2530.
- Grosjean, H., and Fiers, W. (1982). Preferential codon usage in prokaryotic genes: The optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene* **18**: 199—209.
- Gu, Z., Harrod, R., Rogers, E. J., and Lovett, P. S. (1994). Anti-peptidyl transferase leader peptides of attenuation-regulated chloramphenicol-resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5612—5616.
- Ikemura, T. (1981). Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J. Mol. Biol.* **146**: 1—21.
- Kim, J., Klein, P. G., and Mullet, J. E. (1991). Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J. Biol. Chem.* **266**: 14931—14938.
- Lizardi, P. M., Mahdavi, V., Shields, D., and Candelas, G. (1979). Discontinuous translation of silk fibroin in a reticulocyte cell-free system and in intact silk gland cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 6211—6215.
- Nielsen, P. J., and McConkey, E. H. (1980). Evidence for control of protein synthesis in HeLa cells via the elongation rate. *J. Cell Physiol.* **104**: 269—281.
- Obrig, T. G., Moran, T. P., and Brown, J. E. (1987). The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem. J.* **244**: 287—294.
- Protzel, A., and Morris, A. J. (1974). Gel chromatographic analysis of nascent globin chains. Evidence of nonuniform size distribution. *J. Biol. Chem.* **249**: 4594—4600.
- Pulkrabek, P., and Rychlik, I. (1968). Effect of univalent cations and role of GTP and supernatant factors during biosynthesis of polylysine chain. *Biochim. Biophys. Acta* **155**: 219—227.
- Ryazanov, A. G. (1987). Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of elongation factor 2. *FEBS Lett.* **214**: 331—334.
- Svitkin, Yu. V., and Agol, V. I. (1983). Translational barrier in central region of encephalomyocarditis virus genome. Modulation by elongation factor 2 (eEF-2). *Eur. J. Biochem.* **133**: 145—154.
- Theodorakis, N. G., Banerji, S. S., and Morimoto, R. I. (1988). HSP70 mRNA translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. *J. Biol. Chem.* **263**: 14579—14585.
- Wolin, S. L., and Walter, P. (1989). Signal recognition particle mediates a transient elongation arrest of preprolactin in reticulocyte lysate. *J. Cell Biol.* **109**: 2617—2622.

Обзоры, сборники,
монографии

- Candelas, G. C., Carrasco, C. E., Dompenciel, R. E., Arroyo, G., and Candelas, T. M. (1987). Strategies of fibroin production. In: *Translational Regulation of Gene Expression* (ed. Ilan, J.) pp. 209—228. Plenum Press, New York.
- Collier, R. J. (1975). Diphtheria toxin: Mode of action and structure. *Bact. Rev.* **39**: 54—85.
- Heyning, van S. (1980). ADP-ribosylation by bacterial toxins. In *The Enzymology of Post-Translational Modification of Proteins* (eds. Freedman, R. B., and Hawkins, H. C.), vol. **1**, pp. 387—422. Academic Press, London.
- Neidhardt, F. C. (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Olsnes, S., and Pihl, A. (1982). Toxic lectins and related proteins. In *Molecular Actions of Toxins and Viruses* (eds. Cohen, P., and van Heyning, S.), pp. 51—105. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Olsnes, S., and Pihl, A. (1982). Chimeric toxins. *Pharmac. Ther.* **15**: 355—381.
- Pappenheimer, A. M. (1977). Diphtheria toxin. *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 69—94.
- Ryazanov, A. G., Ovchinnikov, L. P., and Spirin, A. S. (1987). Development of structural organization of protein-synthesizing

machinery from prokaryotes to eukaryotes. *BioSystems* **20**: 275—288.

Ryazanov, A. G., Natapov, P. G., Shestakova, E. A., Severin, F. F., and Spirin, A. S. (1988). Phosphorylation of the elongation factor 2: the fifth Ca^{2+} /calmodulin-dependent system of protein phosphorylation. *Biochimie* **70**: 619—626.

Spirin, A. S., and Ryazanov, A. G. (1991). Regulation of elongation rate. In *Translation in Eukaryotes* (ed. Trachsel, H.), pp. 325—350. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Tenson, T., and Ehrenberg, M. (2002). Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell* **108**: 591—594.

ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

13.1. Кодоны терминации

Рибосома считывает мРНК триплет за триплетом и удлиняет (синтезирует) полипептидную цепь до тех пор, пока не дойдет до одного из трех кодонов: UAA, UAG или UGA (Бреннер и др., 1965; Бреннер, Крик и др., 1967). Эти триплеты не имеют своих аминокислот-тРНК, и на них трансляция прекращается. Их называют *кодонами терминации*, или *стоп-кодонами* (старое название — «бессмысленные кодоны»).

Кодон терминации обязательно присутствует в конце кодирующей части каждой природной мРНК. Иногда встречаются даже тандемы стоп-кодонов: приблизительно в одном случае из ста за первым стоп-кодоном следует второй. Соотношения разных стоп-кодонов у разных групп организмов существенно варьируют. Кодон UAA чаще всего используется для терминации трансляции у большинства видов зубактерий, а также у грибов. Кодон UGA, наоборот, доминирует в мРНК млекопитающих (50 %), но составляет всего около 20 % у грибов. Кодон UAG представлен у всех групп эукариот практически одинаково — около 20—25 % (см. Сан и др., 2005). Различия в содержании разных стоп-кодонов особенно резко выражены у архей. Например, у *Methanococcus marinaludis* на долю UAA приходится около 85 % всех стоп-кодонов и по 7—8 % на оставшиеся два. Однако у другой археобактерии, *Haloarcula marismortui*, на UGA приходится около 50 % стоп-кодонов, а остальные делятся примерно поровну между UAA и UAG.

Интерес представляет окружение стоп-кодонов с 5'- и 3'-сторон, т. е. «контекст» терминирующих кодонов, который может влиять на эффективность терминации. Давно было замечено, что у эукариот за кодоном терминации часто следует пуриновый нуклеотид, и, таким образом, в эукариотических мРНК распространены тетрануклеотидные последовательности терминации UAA(A/G) и UGA(A/G). В бактериях такого выраженного предпочтения нет, хотя у *E. coli* можно отметить некоторое преобладание терминирующих последовательностей UAAU и UAAG (Кридж, Тате и др., 2006; см. также обзор: Tate, W. P., and Brown, C. M., 1992), у других видов предпочтительными с 3'-стороны терминирующего триплета оказываются самые различные нуклеотиды.

Необходимо отметить, что вне корректной рамки считывания триплеты UAA, UAG и UGA встречаются гораздо чаще, чем в рамке считывания, где имеется, как правило, всего один терминирующий кодон на всю кодирующую нуклеотидную последовательность. Поэтому обычно случайный сдвиг рамки в процессе элонгации не может привести к синтезу длинного неправильного полипептида и чаще всего заканчивается скорой терминацией этой некорректной трансляции. В не кодирующих участках мРНК, включая межцистронные участки полицистронных мРНК бактерий, частота терминирующих триплетов обычно также высока.

Терминирующий кодон в рамке считывания может появиться в кодирующей части мРНК в результате мутации. Например, замена G на A в триптофановом кодоне UGG приводит к появлению либо UAG, либо UGA; замена C на U в глю-

таминовых кодонах САА и САG приводит к появлению либо UAA, либо UAG. Такие мутации называют *бессмысленными*, или нонсенс-мутациями (*nonsense*); появление UAG обозначается как «янтарная» (*amber*) мутация, UAA — «охровая» (*ochre*), а UGA — «опаловая» (*opal*). В отличие от обычных точечных мутаций, приводящих к замене одного аминокислотного остатка в синтезируемом полипептиде, нонсенс-мутации приводят к преждевременной терминации, происходящей в месте появления «бессмысленного» кодона.

Другая мутация, изменяющая антикодон какой-либо тРНК так, что он становится комплементарным бессмысленному кодону, может привести к *супрессии* бессмысленной мутации; например, тирозиновая тРНК, в которой антикодон GUA заменен на CUA, узнает терминирующий кодон UAG и таким образом супрессирует «янтарную» мутацию. Такие тРНК называют супрессорными. В любой клетке может присутствовать несколько разных по аминокислотной специфичности супрессорных тРНК в очень малых количествах (если бы их было много, они нарушили бы нормальную терминацию на естественных терминирующих кодонах). Следует отметить, что только немногие тРНК могут стать супрессорными, а именно те, у которых антикодон не участвует в узнавании аминокислот-тРНК-синтетаз. К ним относятся, в частности, тРНК, которые присоединяют аминокислоты, кодируемые шестью кодонами (например, лейциновые), и некоторые другие (например, аланиновые).

В процессе трансляции возможны ошибки, в том числе такие, когда нормальный терминирующий кодон, завершающий кодирующую последовательность мРНК, узнается тРНК, частично комплементарной ему. Например, нормальная триптофановая тРНК с антикодоном ССА иногда может узнавать кодон терминации UGA, а глутаминовые тРНК с антикодонами CUG или UUG способны изредка взаимодействовать с терминирующими триплетами UAG или UAA соответственно. Показано, что минорная тирозиновая тРНК с антикодоном GΨA, выделенная из клеток растений или насекомых, взаимодействует с кодоном терминации UAG. Две лейциновые тРНК из печени быка, содержащие антикодоны САА или САG, способны взаимодействовать с терминирующим триплетом UAG. Лизиновая тРНК дрожжей может встраивать свой аминокислотный остаток в растущую цепь вследствие взаимодействия с кодоном UAG. Все это иногда приводит к «*проскакиванию*» транслирующих рибосом за пределы кодирующей последовательности данной мРНК (*read-through*, «сквозное чтение»), в результате которого образуется более длинный полипептид, чем должно быть. Образование таких удлиненных продуктов, в дополнение к основной массе нормального белкового продукта, нередко отмечается при изучении белкового синтеза как *in vivo*, так и *in vitro*. По этой же причине возможно образование небольшого количества нормального продукта у «бессмысленных» мутантов («*leakage*», см. подразд. 9.4.2). При искусственном снижении концентрации белковых факторов терминации (см. подразд. 13.2) в клетках или бесклеточных системах трансляции существенно возрастает уровень ошибок типа «проскакивания» терминирующих кодонов («сквозного чтения»), что объясняется сдвигом конкуренции за терминирующие кодоны между факторами и супрессорными тРНК в пользу последних.

Из трех кодонов терминации самым «слабым» считается UGA: он чаще всего может «проскакиваться» транслирующей рибосомой за счет его узнавания триптофановой тРНК. В некоторых случаях этот терминирующий триплет специально используется природой для образования небольших количеств физиологически важного белка из удлиненного полипептида, в дополнение к основному белково-

му продукту, синтез которого завершается на этом кодоне. Такая ситуация наблюдается, например, в случае трансляции РНК фага Q β . Цистрон белка оболочки этого фага закачивается кодоном терминации UGA, который время от времени «проскакивается» рибосомами, что приводит к синтезу небольших количеств полипептида, значительно более длинного, чем белок оболочки. Этот удлиненный полипептид является необходимым продуктом трансляции фаговой РНК, так как он требуется для сборки полноценной инфекционной фаговой частицы. В РНК-содержащих вирусах растений экспрессия некоторых открытых рамок считывания тоже часто происходит за счет «проскакивания» терминирующего триплета UAG разделяющего два цистрона.

Считывание кодонов мРНК после кодона терминации может происходить также вследствие сдвига рамки на участке терминирующего триплета. Более того, кодон терминации в соответствующем структурном окружении способен сам по себе вызывать сдвиг рамки и, как следствие, «проскакивание». Таким образом, в дополнение к функции сигнала остановки трансляции кодон терминации может обеспечивать «рибосомные прыжки», или «проскакивание» рибосом по мРНК (см. подразд. 11.4.2 и 11.4.3).

Когда сразу за кодоном терминации UGA расположены специальные структурные элементы (в прокариотических мРНК) или когда мРНК в 3'-некодирующей области содержит специфический сигнал (у эукариот), этот терминирующий триплет кодирует селеноцистеин, 21-ю аминокислоту (см. подразд. 2.2 и 9.2.2). В этом случае кодон UGA распознается тРНК^{Sec} с комплементарным антикодоном UCA; тРНК^{Sec} аминоацилируется серином, и затем остаток серина на тРНК^{Sec} в ходе ферментативной реакции превращается в остаток селеноцистеина (см. подразд. 3.5.3, рис. 3.13). У прокариот тРНК^{Sec} связывается с уникальным фактором элонгации SELB (вместо EF-Tu), который взаимодействует со структурными элементами мРНК; это взаимодействие обеспечивает использование кодона UGA, расположенного ближе к 5'-концу мРНК, как кодона, связывающегося с селеноцистеинил-тРНК^{Sec} на транслирующей рибосоме (см. подразд. 9.2.2, рис. 9.6 и 9.7).

Следует также сделать оговорку в отношении митохондриального генетического кода (см. табл. 2.2). В митохондриях млекопитающих и грибов кодон UGA не является терминирующим; вместо этого он связывает триптофановую тРНК, т.е. кодирует триптофан, как и кодон UGG. С другой стороны, в митохондриях позвоночных кодоны AGA и AGG не кодируют аргинин, а служат терминирующими. Два рода примитивных эубактерий, *Mycoplasma* и *Spiroplasma*, также используют кодон UGA как триптофановый, но не как терминирующий (см. табл. 2.1).

13.2. Белковые факторы терминации

Когда терминирующий кодон оказывается в A-участке рибосомы, он узнается специальными растворимыми белками, которые связываются с рибосомой и индуцируют гидролиз сложноэфирной связи между тРНК и полипептидом молекулы пептидил-тРНК в P-участке (см. обзоры: Sarcocchi, M. R., and Klein, H. A., 1969; Caskey, T., et al., 1969). В результате этого полипептид освобождается из рибосомы. Белки, узнающие кодоны терминации и индуцирующие освобождение полипептида, называют *факторами терминации*, или RF (*Release Factors*). Факторы терминации трансляции принято подразделять на два класса — 1 и 2 (табл. 13.1).

Белковые факторы терминации и их кодоны

Прокариоты		Эукариоты и археи	
Фактор	Кодоны	Фактор	Кодоны
Класс 1			
RF1	UAA	eRF1	UAA
	UAG		UAG
RF2	UAA		UGA
	UGA		
Класс 2			
RF3		eRF3	

13.2.1. Факторы терминации класса 1

К классу 1 относятся белки, декодирующие кодоны терминации и индуцирующие гидролитическое расщепление пептидил-тРНК на полипептид и тРНК. У прокариот к этому классу относят RF1 и RF2. У *Escherichia coli* молекулярные массы этих белков составляют 40,5 и 41,2 кДа соответственно. Эти белки структурно и функционально близкородственны, демонстрируя 50%-е сходство их первичных структур и подобную пространственную укладку. Кодон UAA узнается обоими белками, кодон UAG — только RF1, а кодон UGA — только RF2. Любопытно, что в соответствии с митохондриальным генетическим кодом митохондрии млекопитающих не содержат белка RF2, так как в них не используется стоп-кодон UGA.

У эукариот и архей все три терминирующих кодона узнаются единственным фактором класса 1, eRF1 и aRF1 соответственно (Конечкий и др., 1977; Фролова и др., 1994; Донцова и др., 2001). Высокая консервативность структуры eRF1 организмов с универсальным генетическим кодом приводит к возможности функциональных «перекрестов». Например, обнаружена функциональная взаимозаменяемость в терминации трансляции между eRF1 дрожжей и человека, несмотря на их эволюционную удаленность. Молекулярная масса эукариотического eRF1 составляет около 50 кДа. Аминокислотные последовательности эукариотического eRF1 и архейного aRF1 не имеют гомологии с первичными структурами эубактериальных RF1 и RF2 — это совсем разные белки. Имеется, однако, один общий мотив — Gly-Gly-Gln (GGQ), который в обеих структурах играет ключевую роль в функционировании всех факторов терминации класса 1 (см. далее). Что касается третичной структуры, то она тоже различна, но наблюдается большое сходство в размерах белковых молекул, их форме и подразделении на домены.

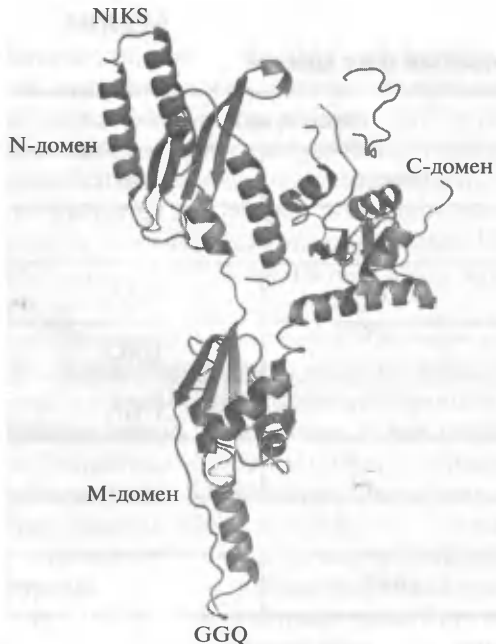


Рис. 13.1. Третьичная и вторичная структуры эукариотического (человеческого) фактора терминации eRF1 по данным рентгеноструктурного анализа (схематическое изображение типа «cartoon»).

Разрывы цепи в С-домене соответствуют участкам, не выявляемым в данном типе кристаллов. NIKS и GGQ — эволюционно консервативные (универсальные для eRF1 всех видов эукариот) аминокислотные последовательности в кодонузнающей и ПТЦ-узнающей петлях соответственно. PDB ID code 1DT9. Song et al. (2000) *Cell* **100**: 311—321

Молекулы как эубактериальных RF1 и RF2, так и эукариотического eRF1 состоят из трех гибко сочлененных структурных блоков. У эукариот белок eRF1 подразделяется на N-концевой домен (N), серединный домен (M) и C-концевой домен (C) (рис. 13.1). У эубактерий структурными модулями белка, функционально эквивалентными вышеуказанным,

являются соответственно: 1) домен 2 с тесно примыкающим доменом 4, образующими фактически один структурно слитый супердомен 2 + 4; 2) вытянутый домен 3 с петлей на дистальном конце; 3) боковой α -спиральный домен 1 (рис. 13.2). Домен 2 + 4 у RF1 и RF2 (или домен N у eRF1) является декодирующим, т. е. он обращен в сторону малой рибосомной субъединицы, входит в А-участок терминирующей рибосомы и узнает находящийся там терминирующий кодон (см. подразд. 13.3). За узнавание нуклеотидных триплетов ответственны определенные олигопептидные последовательности этого домена; в частности, важную роль в узнавании кодонов терминации играют трипептиды Pro-(Ala/Val)-Thr у RF1, Ser-Pro-Phe у RF2 и мотивы Asn-Ile-Lys-Ser (NIKS) и Tyr-X-Cys-X-X-X-Phe у eRF1, расположенные в петле рассматриваемого домена (Ито, Уно и Накамура, 2000; Киселев и др., 2003; Петри, Рамакришнан и др., 2005).

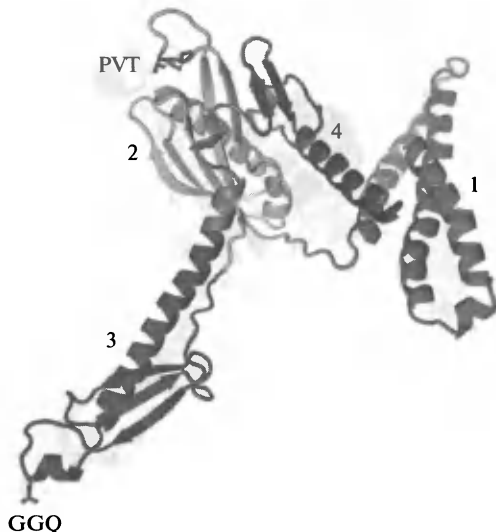
Домен 3 эубактериальных RF1 и RF2 и домен M эукариотического eRF1 содержат на своем дистальном конце универсальный мотив GGQ (Gly-Gly-Gln), присущий всем факторам класса 1 прокариот и эукариот (Фролова, Киселев и др., 1999). Этот мотив принимает участие в гидролизе пептидил-тРНК в пептидилтрансферазном центре большой субъединицы рибосомы. Домен 1 белков RF1 и RF2 и домен C белка eRF1 взаимодействуют с C-концом другого фактора терминации, RF3 или eRF3 соответственно (см. далее).

Интерес с точки зрения терминации трансляции у эукариот представляют простейшие эукариоты — реснитчатые инфузории (цилиаты). У этих одноклеточных организмов один или два кодона терминации «переосмыслены» и являются значимыми, кодирующими одну из природных аминокислот (см. табл. 2.1). Например, у стилионхий остается только один терминирующий кодон UGA, а два других кодируют глутамин. У другой инфузории — эуплоты — наоборот, UGA кодирует аминокислоту цистеин, а UAA и UAG остаются терминирующими кодонами (см. обзор: Knight, R. D., and Landweber, L. F., 2000). Эти различия свя-

Рис. 13.2. Третичная и вторичная структуры зубактериального (*Thermus thermophilus*) фактора терминации RF1 по данным рентгеноструктурного анализа (схематическое изображение типа «cartoon»).

PVT и GGQ — аминокислотные последовательности в кодоузнающей и ПТЦ-узнающей петлях соответственно.

PDB ID 3D5A, 3D5B, 3D5C, 3D5D. Laurberg et al. (2008) *Nature* **454**: 852–857



заны именно со структурой факторов класса 1, а не с изменениями декодирующих свойств рибосом этих организмов (Кервестин и др., 2001). По крайней мере у двух видов инфузорий (эуплоты и стилонихии) изменения декодирующих свойств eRF1 связаны с изменением структуры их N-доменов.

13.2.2. Факторы терминации класса 2

К классу 2 терминирующих факторов относятся белки RF3 прокариот (молекулярная масса 59,5 кДа) и eRF3 эукариот (молекулярная масса около 70 кДа). Эти белки имеют общее свойство — после связывания с рибосомой они, как и факторы элонгации, осуществляют гидролиз ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата. При этом для осуществления гидролиза зубактериальный RF3 не строго нуждается в факторе класса 1, а эукариотический eRF3 обязательно требует присутствия eRF1 (Фролова, Киселев и др., 1996). Интересно, что фактор eRF3 кодирован незаменимым геном, тогда как без гена, кодирующего RF3, бактерии обходятся. Ряд бактерий вообще не имеет этого гена, что не мешает им успешно осуществлять белковый синтез. У архей aRF3 (гомолог RF3 и eRF3) до сих пор не обнаружен.

Оба фактора — зубактериальный RF3 и эукариотический eRF3 — имеют структурное сходство друг с другом, а также с факторами элонгации, и особенно с EF-Tu и eEF1A (рис. 13.3). Как и указанные факторы элонгации, факторы терминации класса 2 состоят из трех глобулярных доменов, и домен I является ГТФ/ГДФ-связывающим, а два других домена β -структурного типа формируют вторую половину молекулы, подвижно связанную с доменом I. По-видимому, и механизм действия фактора терминации класса 2 подобен таковому фактора элонгации EF-Tu или eEF1A, но вместо аминокислотной аминоацил-тРНК фактор терминации в ГТФ-форме взаимодействует с фактором терминации класса 1. При этом ГТФ, очевидно, играет ту же роль расщепляемого эффектора: его связывание с RF3 или eRF3 индуцирует «схлопывание» доменов (переход разомкнутой конформации, показанной на рис. 13.3, в сомкнутую конформацию), что придает RF3 (eRF3) сродство к RF1 и RF2 (eRF1) и к рибосоме, а гидролиз ГТФ, индуцированный

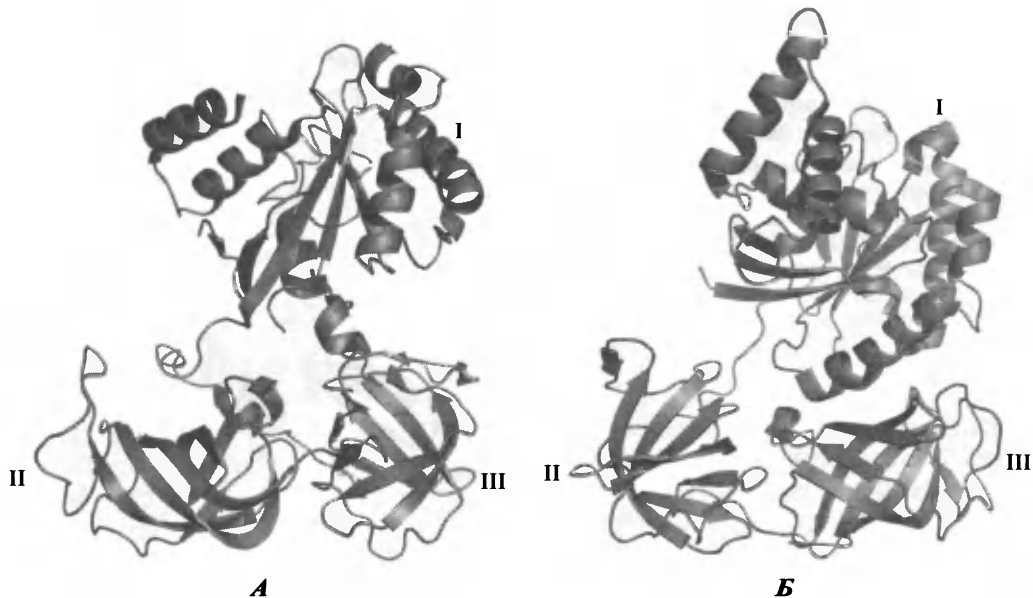


Рис. 13.3. Сравнение третичных и вторичных структур эукариотических (дрожжевых) факторов терминции eRF1 (**А**; PDB ID 1R5N; Kong et al., *Mol. Cell* **14**: 233–245, 2004) и элонгации eEF1A (**Б**: PDB ID 2B7C; Pittman et al., *J. Biol. Chem.* **281**: 19457–19468, 2006) по данным рентгеноструктурного анализа (схематические изображения типа «cartoon»).

Разрывы в цепях соответствуют участкам, не выявляемым в данном типе кристаллов

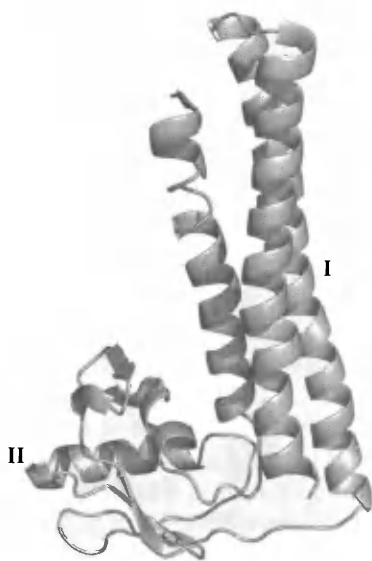
рибосомой, приводит снова к разомкнутой конформации и потере сродства к рибосоме. Показано, что в свободном состоянии вне рибосом RF3 и eRF3 находятся в основном в ГДФ-форме, т.е. в разомкнутой конформации, и замена ГДФ на ГТФ происходит, скорее всего, в процессе связывания с рибосомой и при участии факторов класса 1.

13.2.3. Фактор «повторного использования рибосомы», или RRF (RF4)

У эубактерий в дополнение к факторам терминции класса 1 (RF1 и RF2) и класса 2 (RF3) в процессе терминции участвует еще один белок, названный «фактором повторного использования рибосомы», или RRF (*Ribosome Recycling Factor*) (Хирашима и Каджи, 1972; см. обзор: Janosi, L., et al., 1996), и иногда обозначаемый как RF4. Он оказался необходим для освобождения деацилированной тРНК из рибосомы после завершения основной стадии терминции — гидролитического расщепления сложноэфирной связи пептидил-тРНК и освобождения синтезированного полипептида. RRF (или RF4) — это небольшой основной белок с молекулярной массой около 20 кДа (185 аминокислотных остатков). Его трехмерная структура сильно напоминает таковую L-образной молекулы тРНК (рис. 13.4; опять «молекулярная мимикрия?»), и поэтому некоторое время считалось, что он имитирует молекулу тРНК, чтобы вытеснить из *P*-участка рибосомы деацилированную тРНК. На самом деле это оказалось не совсем так (см. подразд. 13.5).

Рис. 13.4. Третичная и вторичная структуры эубактериального (*Thermus thermophilus*) фактора «повторного использования рибосом» RRF по данным рентгеноструктурного анализа (схематическое изображение типа «cartoon»).

PDB ID 2V46. Weixlbaumer et al. (2007) *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 733–737



Все попытки найти фактор, гомологичный RRF, у эукариот и архей до сих пор не увенчались успехом.

13.3. Связывание факторов терминации с рибосомой

Как уже отмечалось, факторы терминации класса 1 узнают терминирующий кодон, установленный в *A*-участке рибосомы. Соответственно кодонзависимое связывание RF класса 1 возможно только после транслокации пептидил-тРНК из *A*-участка в *P*-участок. В условиях *in vitro* можно непосредственно связать триплет AUG и инициаторную fMet-тРНК с *P*-участком вакантной рибосомы, а затем добавить RF и один из терминирующих кодонов в виде тринуклеотида — UAA, UAG, или UGA; триплет и RF связываются с рибосомой и индуцируют гидролиз Met-тРНК в *P*-участке с освобождением свободного формилметионина. Очевидно, что в этом случае терминирующий триплет и RF попадают в свободный *A*-участок. Тот факт, что супрессорная аминоксил-тРНК с EF-Tu и ГТФ, несущая антикодон, комплементарный терминирующему кодону, конкурирует с RF класса 1, также указывает на взаимодействие RF1, или RF2, или eRF1 с *A*-участком. Антибиотики, действующие на *A*-участок 30S субъединицы, такие как тетрациклин и аминогликозиды (см. подразд. 9.3.1. и 9.3.2.), ингибируют кодонзависимое связывание факторов терминации класса 1 с прокариотической рибосомой (Браун и др., 1993).

Рентгеноструктурный анализ комплексов 70S рибосомы с RF1 и RF2 прямо показал, что связанный с рибосомой фактор действительно находится в *A*-участке (рис. 13.5 и рис. 13.I цв. вкл.), причем универсальный GGQ-мотив домена 3 располагается в пептидилтрансферазном центре большой субъединицы рибосомы, а трипептид Pro-(Ala/Val)-Thr (консервативный PXT-мотив домена 2 фактора RF1) или Ser-Pro-Phe (консервативный SPF-мотив домена 2 фактора RF2) — в декодирующем центре малой рибосомной субъединицы (Лорберг, Ноллер и др., 2008; Петри, Рамакришнан и др., 2005). Эти данные подтвердили и значительно

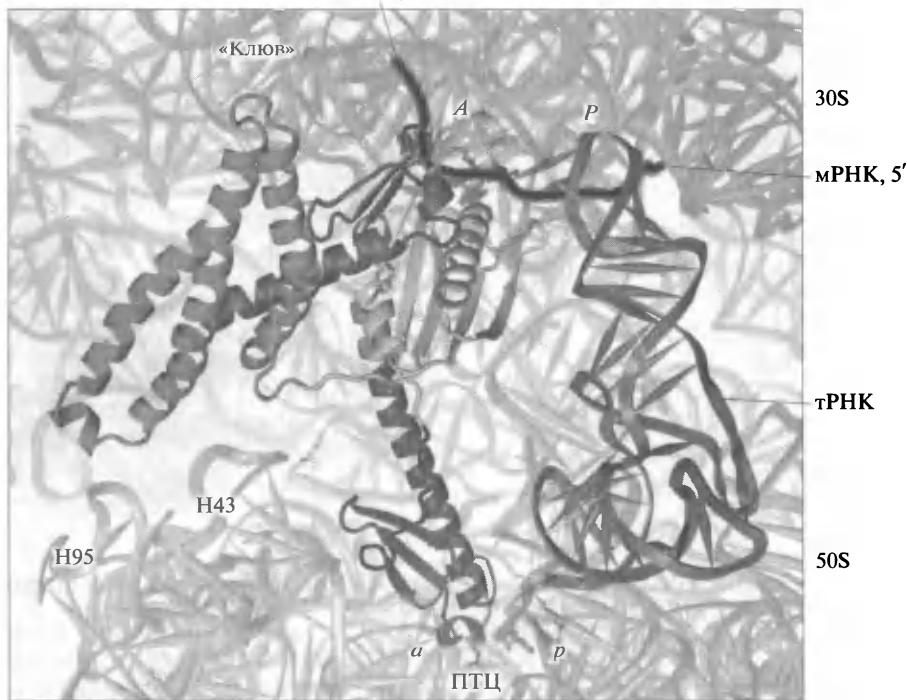


Рис. 13.5. Связывание фактора терминации RF1 с *A*-участком рибосомы рядом с тРНК, связанной с *P*-участком, по данным рентгеноструктурного анализа комплекса бактериальной рибосомы с мРНК, несущей терминирующий кодон UAA, RF1 и формилметионил-тРНК.

PDB ID 3D5A, 3D5B, 3D5C, 3D5D. Laurberg et al. (2008) *Nature* **454**: 852–857

уточнили более ранние результаты криоэлектронной микроскопии, которые указывали на такое же расположение RF2 в *A*-участке рибосомы (Рават, Франк и др., 2003; Клахолец, ван Хил и др., 2003). В случае RF1 боковые цепи остатков пролина и треонина универсального мотива PXT домена 2, как и предполагалось, действительно взаимодействуют с пуриновыми основаниями кодона терминации, но дело этим не ограничивается: в узнавание кодона оказываются вовлеченными группы фактора терминации за пределами указанного мотива, а также рибосомной РНК и мРНК (Лорберг, Ноллер и др., 2008).

Следует отметить, что при связывании факторов RF1 или RF2 с *A*-участком малой субчастицы рибосомы и α -участком ПТЦ большой субъединицы боковой спиральной домен I обоих факторов оказывается контактирующим с районом белка L11 у основания L7/L12-выступа большой субъединицы и с выступом головки («клювом») малой субъединицы, расположенным напротив, у входа в «межшейный» канал. Очевидно, именно расположение этого домена у основания L7/L12-выступа объясняет целый ряд ранних результатов. Например, было показано, что белок L7/L12 способствует связыванию RF1 и RF2 с терминирующей рибосомой, а антибиотик тиострептон, блокирующий факторсвязывающий участок 50S субъединицы (см. подразд. 9.3.3 и 11.6.3), является ингибитором связывания RF. Фактор элонгации EF-G, стабильно связанный с рибосомой, например, в присутствии фусидовой кислоты или с нерасщепляемым аналогом ГТФ, —

также препятствует взаимодействию RF с рибосомой, как и связыванию комплекс-а аминоксил-тРНК•EF-Tu•ГТФ (см. обзоры: Tate, W. P., et al., 1990; Tate, W. P., and Brown, C. M., 1992).

В случае эукариотического фактора терминации eRF1 показано, что он связывается с рибосомой в два этапа. На первом этапе это связывание относительно слабое и не зависит от стоп-кодона. На втором этапе оно целиком зависит от стоп-кодона и гораздо более сильное. Согласно косвенным данным, связывание RF1 и RF2 с рибосомой прокариот может происходить подобным же образом. Интересно, что связывание факторов класса 1 с рибосомой не строго зависит от присутствия фактора класса 2, хотя последний, очевидно, стимулирует это связывание. Для эукариотических факторов терминации было показано, что оба фактора могут образовывать комплекс вне рибосомы и в виде комплекса eRF1•eRF3 связываться с рибосомой.

Механизм совместного действия факторов терминации классов 1 и 2, по-видимому, похож на таковой для тройственного комплекса Aa-tRNA•EF1A•GTP во время элонгации: RF1 или RF2 имитирует остаток тРНК, а RF3 — белок EF1A. Так же как и в случае тройственного комплекса элонгации, RF1/2-компонент комплекса RF1/2•RF3•GTP или eRF1-компонент комплекса eRF1•eRF3•GTP занимает A-участок на малой рибосомной субъединице с размещенным в нем терминирующим кодоном, в то время как RF3-компонент садится на факторсвязывающий участок большой рибосомной субъединицы, переводя рибосому в переходное состояние, компетентное для осуществления следующего шага. Затем рибосома (ее ГТФазный центр) индуцирует гидролиз ГТФ на RF3 (или eRF3), происходит освобождение RF3/eRF3•GDP из рибосомы и переход рибосомы в состояние, компетентное для осуществления гидролитической реакции. Эта схема впервые была предложена Накамурой с сотрудниками (Ито и др., 1996) для RF1/RF2•RF3 прокариот, но позднее получила экспериментальное подтверждение для eRF3 эукариот (Алкалаева, Киселев, Пестова и др., 2006).

13.4. Гидролиз пептидил-тРНК

Кодонзависимое связывание фактора терминации необходимо для гидролиза пептидил-тРНК в P-участке и последующего освобождения полипептида из рибосомы. Гидролиз пептидил-тРНК в рибосоме ингибируется теми же антибиотиками, которые подавляют пептидилтрансферазную реакцию. Так, хлорамфеникол, амицетин, линкомицин, гугеротин, спарсомицин и другие типичные ингибиторы рибосомной пептидилтрансферазы (см. подразд. 10.3) подавляют RF-индуцированное освобождение полипептида из бактериальных рибосом, при том, что эти антибиотики не ингибируют кодонзависимого связывания RF класса 1 с бактериальной рибосомой. Следовательно, гидролиз пептидил-тРНК при терминеции осуществляется, во всяком случае, с участием пептидилтрансферазного центра рибосомы (ПТЦ).

Как уже указывалось, взаимодействуя с терминирующим кодоном и рибосомой, факторы терминации (RF1 и RF2 у прокариот или eRF1 у эукариот) имитируют связывание аминоксил-тРНК в A-участке транслирующей рибосомы при занятом молекулой пептидил-тРНК P-участке. Соответственно в p-участке ПТЦ оказывается сложноэфирная группа пептидил-тРНК, а в a-участке ПТЦ — мотив GGQ фактора терминации класса 1. В такой ситуации вместо атаки сложно-

эфирной связи пептидил-тРНК аминокруппой аминоксил-тРНК происходит атака на ту же связь, но со стороны молекулы воды. Хотя участие ПТЦ в этой реакции гидролиза несомненно, оказалось, что остаток глутамин (Q) дистальной петли домена 3 (см. рис. 13.2) или домена М (см. рис. 13.1) тоже вовлечен в этот процесс: он взаимодействует с ПТЦ и рибозным остатком 3'-концевого нуклеотида (A76) тРНК в *p*-участке, его пептидная группа главной цепи (но не амидная группа боковой цепи!) устанавливается в таком положении, что играет основную роль в катализе гидролиза пептидил-тРНК, по-видимому, стабилизируя тетраэдрический интермедиат при атаке сложноэфирной группы молекулой воды (Лорберг, Ноллер и др., 2008). Кроме того, по-видимому, кодонзависимое связывание фактора терминации класса 1 и проникновение его петли в ПТЦ делает последний более доступным для воды, которая служит хорошим акцепторным субстратом для пептидного остатка пептидил-тРНК; в результате атаки атома кислорода воды на атом кислорода сложноэфирной группы происходит эффективный перенос пептида на воду, тем более что конкурирующая аминокруппа аминоксил-тРНК в данных условиях отсутствует.

Следует отметить, что любые замены одного из двух остатков глицина в универсальном мотиве GGQ приводят к полной потере способности факторов терминации класса 1 индуцировать гидролиз пептидил-тРНК как у прокариот, так и у эукариот (Frolova et al., 1999).

Как показывают данные рентгеноструктурного анализа и ЯМР, конформация петли с мотивом GGQ не фиксирована; вероятно, при замене Gly на аминокислотные остатки с объемными боковыми группами петля теряет гибкость («замораживается»), что приводит к ее неспособности участвовать в гидролитической реакции.

Гидролиз сложноэфирной связи в *p*-участке ПТЦ приводит, по-видимому, не только к освобождению полипептидной цепи из рибосомы, но и к конформационной перестройке, ослабляющей удержание в рибосоме фактора терминации, который спонтанно освобождается из *A*-участка.

13.5. Эвакуация деацелированной тРНК

После гидролитического расщепления пептидил-тРНК, находящейся в *P*-участке, на тРНК и пептид, деацелированная тРНК должна занять промежуточное положение *P/e*, как и после завершения реакции транспептидации между пептидил-тРНК и аминоксил-тРНК в элонгационном цикле (см. подразд. 10.4). Однако в элонгационном цикле вслед за транспептидацией происходит транслокация, в результате которой деацелированная тРНК оказывается выброшенной из *P*-участка, куда переходит удлиненная пептидил-тРНК. При терминации подобной ситуации нет, но *P*-участок рибосомы должен быть освобожден для ее вхождения в новый раунд трансляции, начинающийся с инициации. У эубактерий освобождение рибосомы (ее *P*-участка) от деацелированной тРНК происходит с участием специального «фактора повторного использования рибосомы» — *Ribosome Recycling Factor*, RRF (см. подразд. 13.2.3). В этом акте участвует также и рибосомная «транслоказа» — фактор элонгации EF-G с ГТФ.

Поскольку молекула RRF по размерам и форме очень похожа на молекулу тРНК (см. рис. 13.4), то предполагалось, что после гидролиза пептидил-тРНК и

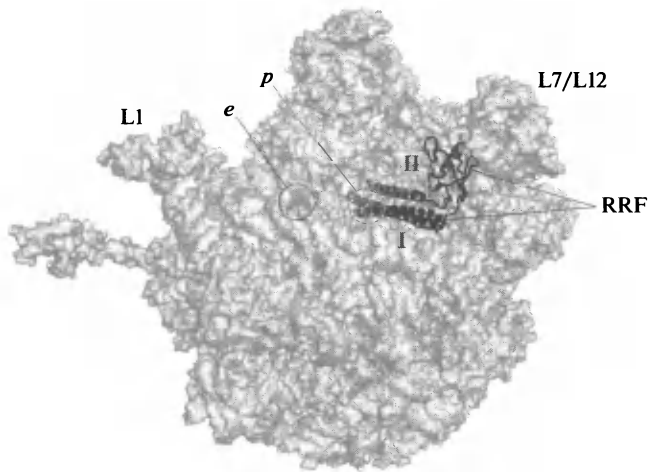


Рис. 13.6. Связывание эубактериального (*Escherichia coli*) фактора RRF на контактирующей поверхности 50S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа терминалирующего комплекса бактериальной рибосомы с RRF.

Пунктирным кружком указан *p*-участок ПТЦ, сплошным кружком — *e*-участок, связывавший 3'-конец уходящей деацелированной тРНК. Трехспиральный домен I RRF перекрывает *p*-участок, а глобулярный домен II связывается с фактором элонгации EF-G (на рисунке не показан) у основания L7/L12-стержня. PDB ID 2QBE. Borovinskaya et al. (2007). *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 727–732

освобождения RF1 или RF2 из рибосомы в вакантный *A*-участок приходит тРНК-подобный RRF, а EF-G с ГТФ катализирует транслокацию RRF в *P*-участок, тем самым вытесняя оттуда деацелированную тРНК. Однако рентгеноструктурный анализ комплекса 70S рибосомы с RRF показал, что RRF не занимает *A*-участка и вообще не имитирует тРНК при связывании с рибосомой (Вайксльбаумер, Рамакришнан и др., 2007; Боровинская, Каджи, Кейт и др., 2007). Было установлено, что RRF не связан с 30S субъединицей, не имеет никаких контактов с 16S рРНК и целиком сидит на 50S субъединице, своим вытянутым трехспиральным доменом I простираясь от *p*-участка ПТЦ через свободный *a*-участок, в то время как глобулярный домен II оказывается вблизи основания L7/L12-стержня, т.е. у факторсвязывающего участка рибосомы (рис. 13.6 и рис. 13.11 цв. вкл.). Такое расположение RRF совместимо только с положением *P/e* деацелированной тРНК, но не с ее *P/p*-положением. Биохимические эксперименты и мутационный анализ указывают и на другую важную деталь: глобулярный домен II фактора RRF важен для взаимодействия с EF-G, но не с самой рибосомой (Гуо, Джинг и др., 2006). Таким образом, весьма вероятно, что связанный RRF привлекает EF-G с ГТФ на факторсвязывающий участок 50S субъединицы, после чего происходит конформационное изменение рибосомы, характерное для транслокации, при котором RRF способствует переходу деацелированной тРНК из состояния *P/e* в состояние *E/e*, где она слабо удерживается и после гидролиза ГТФ, как и в случае элонгационного цикла, освобождается из рибосомы.

Кроме того, RRF взаимодействует со спиралью домена IV 23S рРНК, участвующей в формировании одного из самых сильных контактов между рибосомными субъединицами, вызывая ее конформационное изменение и тем самым ослабляя ассоциацию субъединиц.

Следует отметить, что аминокликозидные антибиотики тоже взаимодействуют со спиралью H69 и блокируют действие RRF как фактора, вызывающего диссоциацию терминирующих рибосом.

13.6. Общий сценарий последовательности событий в процессе терминации

Итак, терминация трансляции включает в себя несколько последовательных шагов, на основании знания которых можно представить предположительный сценарий последовательности всех событий в ходе терминации (рис. 13.7).

Первый шаг — связывание фактора терминации класса 1 — RF1 или RF2 у эубактерий и eRF1 у эукариот — с вакантным A-участком рибосомы и узнавание терминирующего кодона, установленного там в результате полного прочтения кодирующей части мРНК. Связывание сопровождается взаимодействием фактора класса 1 с ГТФ-формой фактора класса 2 — RF3 или eRF3; это взаимодействие может происходить уже на рибосоме (у эубактерий) или заранее, в растворе (у эукариот).

Так или иначе, комплекс двух факторов оказывается связанным, с одной стороны, с A-участком на малой рибосомной субъединице (фактор класса 1) и, с другой — с общим факторсвязывающим центром в районе L11•L10•(L7/L12)₄ стержня большой рибосомной субъединицы.

У прокариот возможно и «бесфакторное» связывание фактора терминации класса 1, т.е. связывание без RF3; как и в случае бесфакторного связывания аминоацил-тРНК в элонгационном цикле (см. подразд. 9.2.2 и 11.3, а также рис. 11.5), такое связывание RF1 или RF2 должно быть существенно медленнее, но вполне продуктивно для узнавания терминирующего кодона. Очевидно, что участие ГТФ-формы RF3 или eRF3 является каталитическим, как и в случаях факторов элонгации, и необходимо для поддержания переходного конформационного состояния рибосомы.

Второй шаг — гидролиз ГТФ и освобождение RF3 или eRF3. Это позволяет рибосоме перейти от промежуточного (переходного) состояния к состоянию, когда фактор класса 1, связанный с терминирующим кодоном и A-участком малой рибосомной субъединицы, вступает в контакт с пептидилтрансферазным центром (ПТЦ) большой рибосомной субъединицы.

Третий шаг — гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК в р-участке ПТЦ и освобождение полипептидной цепи из рибосомы. Рибосома остается связанной с мРНК и деацилированной тРНК в Р-участке, но свободный акцепторный конец тРНК перехватывается е-участком вблизи пептидилтрансферазного центра на большой рибосомной субъединице (как и в случае реакции транспептидации в элонгационном цикле — см. подразд. 10.4). Не установлено, покидает ли фактор терминации (RF1, RF2 или eRF1) рибосому на этой стадии с сопутствующим конформационным изменением рибосомы или это происходит на следующей стадии.

Четвертый шаг, известный только для терминации у эубактерий, — связывание «фактора повторного использования рибосомы» RRF и фактора элонгации EF-G с ГТФ. RRF связывается с рибосомой так, что одним своим доменом перекрывает участки связывания тРНК и RF1 или RF2 на 50S рибосомной субъединице, а другим взаимодействует с EF-G, связанным с факторсвязывающим цен-

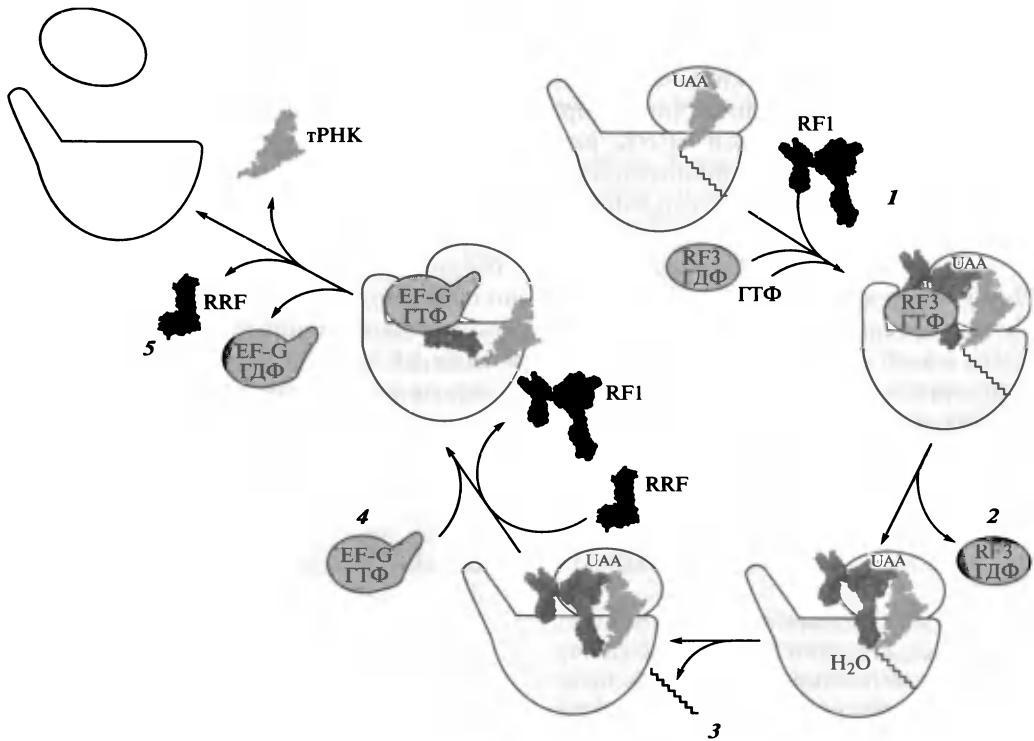


Рис. 13.7. Схема вероятной последовательности событий в ходе терминции трансляции у эубактерий.

- 1: связывание факторов терминции класса 1 (RF1 или RF2) и класса 2 (RF3 + ГТФ) с рибосомой, в которой установлен терминирующий кодон в А-участке, а Р-участок занят пептидил-тРНК.
- 2: гидролиз ГТФ на факторе терминции RF3 и освобождение RF3 + ГДФ из рибосомы.
- 3: гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК и освобождение полипептида из рибосомы.
- 4: связывание фактора «повторного использования рибосом» RRF и фактора элонгации EF-G + ГТФ с рибосомой и освобождение RF1 или RF2 из рибосомы.
- 5: гидролиз ГТФ на факторе элонгации EF-G и освобождение EF-G + ГДФ, деацилированной тРНК и RRF из рибосомы

тром в районе L11•L10•(L7/L12)₄ стержня этой субъединицы. Не исключено, что такое связывание RRF и приводит к вытеснению RF1 или RF2. По-видимому, связывание EF-G с ГТФ необходимо для перевода посттерминационной рибосомы в состояние, переходное для последующей эвакуации деацилированной тРНК.

Пятый шаг — гидролиз ГТФ, освобождение EF-G, эвакуация деацилированной тРНК и диссоциация терминирующей рибосомы на субъединицы. Скорее всего, именно гидролиз ГТФ и уход EF-G переводит рибосому в состояние, вынуждающее деацилированную тРНК покинуть рибосому, а присутствие RRF приводит к диссоциации рибосомы на субъединицы.

Ассоциация двух рибосомных субъединиц в вакантной рибосоме гораздо слабее, чем в рибосоме, несущей лиганды, и, следовательно, освобождение лигандов способствует обратимой диссоциации субъединиц. RRF, нарушая один из главных межсубъединичных контактов, в еще большей степени вынуждает рибосому диссоциировать на субъединицы.

В результате диссоциации большая рибосомная субъединица уходит, а малая субъединица может некоторое время оставаться в лабильной связи с мРНК и скользить вдоль нее вплоть до диссоциации от мРНК или реинициации трансляции на следующем цистроне (у прокариот; см. гл. 14 и 15) либо, в случае нековалентной циклизации мРНК, реинициации на той же матрице (у эукариот; см. гл. 14 и 16). Малая рибосомная субъединица, диссоциировавшая от мРНК, взаимодействует с факторами инициации и с их помощью входит в новый раунд трансляции.

К сожалению, посттерминационные стадии у эукариот почти не изучены. Довольно очевидно, что они существенно отличаются от таковых у прокариот. Во всяком случае ни об аналоге фактора «повторного использования рибосомы» RRF, ни об участии фактора элонгации типа EF2 с ГТФ на стадиях вслед за гидролизом пептидил-тРНК в эукариотических рибосомах сведений нет. Возможно, что у эукариот функцию «повторного использования рибосомы» целиком берут на себя их многофункциональные факторы инициации трансляции.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 13

- Alkalaeva, E. Z., Pisarev, A. V., Frolova, L. Yu., Kisselev, L. L., and Pestova, T. V. (2006). In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**: 1125—1136.
- Brenner, S., Stretton, A. O. W., Kaplan, S. (1965). Genetic code: The 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression. *Nature* **206**: 994—998.
- Brenner, S., Barnett, L., Katz, E. R., and Crick, F. H. C. (1967). UGA: A third nonsense triplet in the genetic code. *Nature* **213**: 449—450.
- Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J. H. D. (2007). Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 727—732.
- Brown, C. M., McCaughan, K. K., and Tate, W. P. (1993). Two regions of the *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA are important for decoding stop signals in polypeptide chain termination. *Nucl. Acids Res.* **21**: 2109—2115.
- Cridge, A. G., Major, L. L., Mahagaonkar, A. A., Poole, E. S., Isaksson, L. A., and Tate, W. P. (2006). Comparison of characteristics and function of translation termination signals between and within prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1959—1973.
- Dontsova, M., Frolova, L., Vassilieva, J., Pindl, W., Kisselev, L., and Garber, M. (2000). Translation termination factor aRF1 from the archaeon *Methanococcus jannaschii* is active with eukaryotic ribosomes. *FEBS Lett.* **472**: 213—216.
- Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H. H., Cheperegina, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A. L., Celis, J. E., Philippe, M., Justesen, J., and Kisselev, L. L. (1994). A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* **372**: 701—703.
- Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L. L. (1996). Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* **2**: 334—341.
- Frolova, L. Y., Tsvikovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., Blinov, V. M., Tatkov, S. I., and Kisselev, L. L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class-1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* **5**: 1014—1020.
- Guo, P., Zhang, L., Zhang, H., Feng, Y., and Jing, G. (2006). Domain II plays a crucial

- role in the function of ribosome recycling factor. *Biochem. J.* **393**: 767—777.
- Hirashima, A., and Kaji, A. (1972). Factor-dependent release of ribosomes from messenger RNA. Requirement for two heat-stable factors. *J. Mol. Biol.* **65**: 43—58.
- Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000). A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* **403**: 680—684.
- Ito, K., Ebihara, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (1996). Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5443—5448.
- Kervestin, S., Frolova, L., Kisselev, L., and Jean-Jean, O. (2001). Stop codon recognition in ciliates: Euplotes release factor does not respond to reassigned UGA codon. *EMBO Rep.* **2**: 680—684.
- Klaholz, B. P., Pape, T., Zavialov, A. V., Myasnikov, A. G., Orlova, E. V., Vestergaard, B., Ehrenberg, M., and van Heel, M. (2003). Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature* **421**: 90—94.
- Konecki, D. S., Aune, K. C., Tate, W. P., and Caskey, C. T. (1977). Characterization of reticulocyte release factor. *J. Biol. Chem.* **252**: 4514—4520.
- Kong, C., Ito, K., Walsh, M. A., Wada, M., Liu, Y., Kumar, S., Barford, D., Nakamura, Y., and Song, H. (2004). Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Mol. Cell* **2**: 233—245.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H. F. (2008). Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* **454**: 852—857.
- Petry, S., Brodersen, D. E., Murphy, F. V., Dunham, C. M., Selmer, M., Tarry, M. J., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2005). Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell* **123**: 1255—1266.
- Rawat, U. B., Zavialov, A. V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R. A., Linde, J., Vestergaard, B., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003). A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* **421**: 87—90.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A. K., Webb, H. M., Evans, D. R., Tuite, M. F., Hemmings, B. A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1 — mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* **100**: 311—321.
- Sun, J., Chen, M., Xu, J., and Luo, J. (2005). Relationships among stop codon usage bias, its context, isochores, and gene expression level in various eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **61**: 437—444.
- Weixlbaumer, A., Petry, S., Dunham, C. M., Selmer, M., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2007). Crystal structure of the ribosome recycling factor bound to the ribosome. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 733—737.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., & Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**: 4065—4072.

Обзоры и сборники

- Киселев, Л. Л. (2003). Факторы терминации трансляции первого класса — функциональные аналоги аминокил-тРНК. *Молекулярная биология* **37**: 1—13.
- Capecchi, M. R., and Klein, H. A. (1969). Characterization of three proteins involved in polypeptide chain termination. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 469—477.
- Caskey, T., Scolnick, E., Tomkins, R., Goldstein, J., and Milman, G. (1969). Peptide chain termination, codon, protein factor, and ribosomal requirements. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 479—488.
- Caskey, C. T. (1980). Peptide chain termination. *Trends Biochem. Sci.* **5**: 234—237.
- Craigien, W. J., Lee, C. C., and Caskey, C. T. (1990). Recent advances in peptide chain termination. *Mol. Microbiol.* **4**: 861—865.

В результате диссоциации большая рибосомная субъединица уходит, а малая субъединица может некоторое время оставаться в лабильной связи с мРНК и скользить вдоль нее вплоть до диссоциации от мРНК или реинициации трансляции на следующем цистроне (у прокариот; см. гл. 14 и 15) либо, в случае нековалентной циклизации мРНК, реинициации на той же матрице (у эукариот; см. гл. 14 и 16). Малая рибосомная субъединица, диссоциировавшая от мРНК, взаимодействует с факторами инициации и с их помощью входит в новый раунд трансляции.

К сожалению, посттерминационные стадии у эукариот почти не изучены. Довольно очевидно, что они существенно отличаются от таковых у прокариот. Во всяком случае ни об аналоге фактора «повторного использования рибосомы» RRF, ни об участии фактора элонгации типа EF2 с ГТФ на стадиях вслед за гидролизом пептидил-тРНК в эукариотических рибосомах сведений нет. Возможно, что у эукариот функцию «повторного использования рибосомы» целиком берут на себя их многофункциональные факторы инициации трансляции.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 13

- Alkalaeva, E. Z., Pisarev, A. V., Frolova, L. Yu., Kisselev, L. L., and Pestova, T. V. (2006). In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* **125**: 1125—1136.
- Brenner, S., Stretton, A. O. W., Kaplan, S. (1965). Genetic code: The 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression. *Nature* **206**: 994—998.
- Brenner, S., Barnett, L., Katz, E. R., and Crick, F. H. C. (1967). UGA: A third nonsense triplet in the genetic code. *Nature* **213**: 449—450.
- Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J. H. D. (2007). Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 727—732.
- Brown, C. M., McCaughan, K. K., and Tate, W. P. (1993). Two regions of the *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA are important for decoding stop signals in polypeptide chain termination. *Nucl. Acids Res.* **21**: 2109—2115.
- Cridge, A. G., Major, L. L., Mahagaonkar, A. A., Poole, E. S., Isaksson, L. A., and Tate, W. P. (2006). Comparison of characteristics and function of translation termination signals between and within prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1959—1973.
- Dontsova, M., Frolova, L., Vassilieva, J., Pindl, W., Kisselev, L., and Garber, M. (2000). Translation termination factor aRF1 from the archaeon *Methanococcus jannaschii* is active with eukaryotic ribosomes. *FEBS Lett.* **472**: 213—216.
- Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H. H., Cheperegina, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A. L., Celis, J. E., Philippe, M., Justesen, J., and Kisselev, L. L. (1994). A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* **372**: 701—703.
- Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L. L. (1996). Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* **2**: 334—341.
- Frolova, L. Y., Tsvikovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., Blinov, V. M., Tatkov, S. I., and Kisselev, L. L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class-1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* **5**: 1014—1020.
- Guo, P., Zhang, L., Zhang, H., Feng, Y., and Jing, G. (2006). Domain II plays a crucial

- role in the function of ribosome recycling factor. *Biochem. J.* **393**: 767—777.
- Hirashima, A., and Kaji, A. (1972). Factor-dependent release of ribosomes from messenger RNA. Requirement for two heat-stable factors. *J. Mol. Biol.* **65**: 43—58.
- Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000). A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* **403**: 680—684.
- Ito, K., Ebihara, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (1996). Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5443—5448.
- Kervestin, S., Frolova, L., Kisselev, L., and Jean-Jean, O. (2001). Stop codon recognition in ciliates: Euplotes release factor does not respond to reassigned UGA codon. *EMBO Rep.* **2**: 680—684.
- Klaholz, B. P., Pape, T., Zavialov, A. V., Myasnikov, A. G., Orlova, E. V., Vestergaard, B., Ehrenberg, M., and van Heel, M. (2003). Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature* **421**: 90—94.
- Konecki, D. S., Aune, K. C., Tate, W. P., and Caskey, C. T. (1977). Characterization of reticulocyte release factor. *J. Biol. Chem.* **252**: 4514—4520.
- Kong, C., Ito, K., Walsh, M. A., Wada, M., Liu, Y., Kumar, S., Barford, D., Nakamura, Y., and Song, H. (2004). Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Mol. Cell* **2**: 233—245.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H. F. (2008). Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* **454**: 852—857.
- Petry, S., Brodersen, D. E., Murphy, F. V., Dunham, C. M., Selmer, M., Tarry, M. J., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2005). Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell* **123**: 1255—1266.
- Rawat, U. B., Zavialov, A. V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R. A., Linde, J., Vestergaard, B., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003). A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* **421**: 87—90.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A. K., Webb, H. M., Evans, D. R., Tuite, M. F., Hemmings, B. A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1 — mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* **100**: 311—321.
- Sun, J., Chen, M., Xu, J., and Luo, J. (2005). Relationships among stop codon usage bias, its context, isochores, and gene expression level in various eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **61**: 437—444.
- Weixlbaumer, A., Petry, S., Dunham, C. M., Selmer, M., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2007). Crystal structure of the ribosome recycling factor bound to the ribosome. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 733—737.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., & Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**: 4065—4072.

Обзоры и сборники

- Киселев, Л. Л. (2003). Факторы терминации трансляции первого класса — функциональные аналоги аминоктил-тРНК. *Молекулярная биология* **37**: 1—13.
- Capecchi, M. R., and Klein, H. A. (1969). Characterization of three proteins involved in polypeptide chain termination. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 469—477.
- Caskey, T., Scolnick, E., Tomkins, R., Goldstein, J., and Milman, G. (1969). Peptide chain termination, codon, protein factor, and ribosomal requirements. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 479—488.
- Caskey, C. T. (1980). Peptide chain termination. *Trends Biochem. Sci.* **5**: 234—237.
- Craigie, W. J., Lee, C. C., and Caskey, C. T. (1990). Recent advances in peptide chain termination. *Mol. Microbiol.* **4**: 861—865.

- Janosi, L., Hara, H., Zhang, S., and Kaji, A. (1996). Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF) — an important but overlooked step of protein biosynthesis. *Adv. Biophys.* **32**: 121 — 201.
- Kisselev, L.L., Ehrenberg, M., and Frolova, L. Yu. (2003). Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors. *EMBO J.* **22**: 175 — 182.
- Knight, R. D., and Landweber, L. F. (2000). The early evolution of the genetic code. *Cell* **101**: 569 — 572.
- Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Landweber, L.F. (2001). The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. *Curr. Biol.* **11**: 65 — 74.
- Nakamura, Y., and Ito, K. (2003). Making sense of mimic in translation termination. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 99 — 105.
- Pooler, E., and Tate, W. (2000). Release factors and their role as decoding proteins: specificity and fidelity for termination of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1493**: 1 — 11.
- Pooler, E. S., Askarian-Amiri, M. E., Major, L. L., McCaughan, K. K., Scarlett, D. J., Wilson, D. N., and Tate, W.P. (2003). Molecular mimicry in the decoding of translational stop signals. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **74**: 83 — 121.
- Tate, W. P., and Brown, C. M. (1992). Translational termination: 'Stop' for protein synthesis or 'pause' for regulation of gene expression. *Biochemistry* **31**: 2443 — 2450.
- Tate, W.P., Brown, C. M., and Kastner, B. (1990). Codon recognition by the polypeptide release factor. In: *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 393 — 401. ASM Press, Washington, D. C.

ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

14.1. Общие принципы

Вакантные рибосомные частицы после терминации могут быть снова вовлечены в трансляцию. Живая природа использует несколько путей инициации трансляции новой матрицы, а также реинициации трансляции следующей кодирующей последовательности на той же самой полицистронной мРНК (у прокариот) или реинициации трансляции той же моноцистронной мРНК (у эукариот) вакантными посттерминационными рибосомами.

14.1.1. Значение стадии инициации

Для мРНК-зависимой элонгации полипептида, осуществляемой рибосомами, необходимо наличие пептидил-тРНК как субстрата, реагирующего с аминоацил-тРНК, вошедшей в рибосому и связанной с кодоном. Иными словами, в рибосомном *P*-участке должен быть размещен донорный субстрат, который удлинится следующим аминокислотным остатком. Следовательно, для того чтобы начать трансляцию, должен существовать специальный механизм, который позволяет разместить донорный субстрат в *P*-участке пустой (нетранслирующей) рибосомы. Этот механизм *инициации трансляции* обсуждается ниже.

Механизм инициации может рассматриваться как модифицированный элонгационный цикл (см. рис. 8.3 и 11.5). Специальная инициаторная аминоацил-тРНК, будучи в комплексе со специальным фактором инициации и ГТФ, связывается с инициаторным кодоном на мРНК в рибосоме. Эта стадия выглядит очень похожей на стадию связывания комплекса $Aa-tRNA \bullet EF1A \bullet DTP$ в элонгационном цикле. Однако в процессе связывания инициаторная тРНК направляется в *P*-, а не в *A*-участок рибосомы. Это соотносится с тем фактом, что соответствующий фактор инициации (IF2 в случае прокариот) структурно и функционально похож на EF2 (EF-G у прокариот и eEF2 у эукариот). Таким образом, в процессе связывания инициаторной аминоацил-тРНК можно видеть элементы транслокации. Затем инициаторная аминоацил-тРНК, занимающая *P*-участок, функционирует как донорный субстрат в последующей реакции с элонгаторной аминоацил-тРНК, связанной в *A*-участке, функционально имитируя пептидил-тРНК в элонгационном цикле. У прокариот инициаторная аминоацил-тРНК имеет сходство с пептидил-тРНК также и с химической точки зрения: ее аминокислотная группа формилирована, т. е. вовлечена в образование амидной связи.

Инициация трансляции означает не просто начало процесса элонгации пептида. Это также начало считывания матрицы в специфической точке матричного полинуклеотида. Так как начало кодирующей последовательности не совпадает с 5'-концом матричного полинуклеотида, а всегда находится на некотором (иногда весьма значительном) расстоянии от него, необходимо безошибочное узнавание первого кодона. Точное определение старта чрезвычайно важно для трансляции,

так как это устанавливает должную рамку считывания на всей последующей кодирующей последовательности данной мРНК для ее считывания триплет за триплетом. Таким образом, нахождение первого кодона, на котором устанавливаются как старт, так и рамка считывания, является еще одной фундаментальной функцией механизма инициации.

Более того, инициация представляет собой основной этап, на котором происходит контроль синтеза белка на уровне трансляции (см. гл. 15 и 16). Регуляция на уровне трансляции может рассматриваться как разрешение или, наоборот, запрещение инициации считывания мРНК рибосомами. Именно этим путем достигается избирательная или преимущественная трансляция одних мРНК (или цистронов мРНК у прокариот) и выключение или частичное подавление трансляции других. Кроме того, различная скорость инициации на разных мРНК (или на разных цистронах) определяет соотношение продукции соответствующих белков. Механизм инициации может либо сам проявлять избирательность в отношении различных мРНК, либо выступать в качестве мишени действия позитивных и негативных регуляторных сигналов.

14.1.2. Прокариотический и эукариотический способы инициации

В живой природе существуют два основных способа инициации трансляции. Для первого способа необходим 5'-конец мРНК, несмотря на то, что кодон инициации всегда расположен на некотором отдалении от него. Предполагается, что рибосома связывается с 5'-концом, обычно модифицированным (кэп-модификация, см. рис. 2.4), и затем начинает сканировать нуклеотидную последовательность в направлении к 3'-концу до тех пор, пока не дойдет до инициаторного кодона (рис. 14.1, *А*). Этот способ (так называемая *5'-терминальная инициация*) используется преимущественно в клетках эукариот. Механизм инициации включает распознавание кэпированного 5'-конца с помощью специальных белковых факторов, АТФ-зависимое продвижение рибосомной частицы в направлении к 3'-концу мРНК в процессе сканирования 5'-концевой нетранслируемой области (5'-НТО), фиксацию рибосомы на инициаторном кодоне и т. д.

Другой способ инициации — так называемая *внутренняя инициация*, когда рибосома связывается непосредственно со структурами мРНК, содержащими инициаторный кодон внутри себя или вблизи, независимо от конца мРНК (рис. 14.1, *Б*). Такой способ присущ прокариотам. (Однако многие эукариотические вирусы также используют механизмы внутренней инициации трансляции на специальных структурах их РНК — см. подразд. 14.3.3.) У прокариот рибосома может связываться с синтезируемой мРНК и начинать трансляцию во время синтеза мРНК (сопряженная транскрипция/трансляция). На полицистронных мРНК прокариот инициация и последующая трансляция могут происходить независимо на разных кодирующих последовательностях (цистронах) одной и той же цепи РНК.

14.1.3. Основные участники механизма инициации

Во всех случаях процесс инициации трансляции требует наличия: 1) малой рибосомной субъединицы (30S у прокариот или 40S у эукариот); 2) мРНК с ее

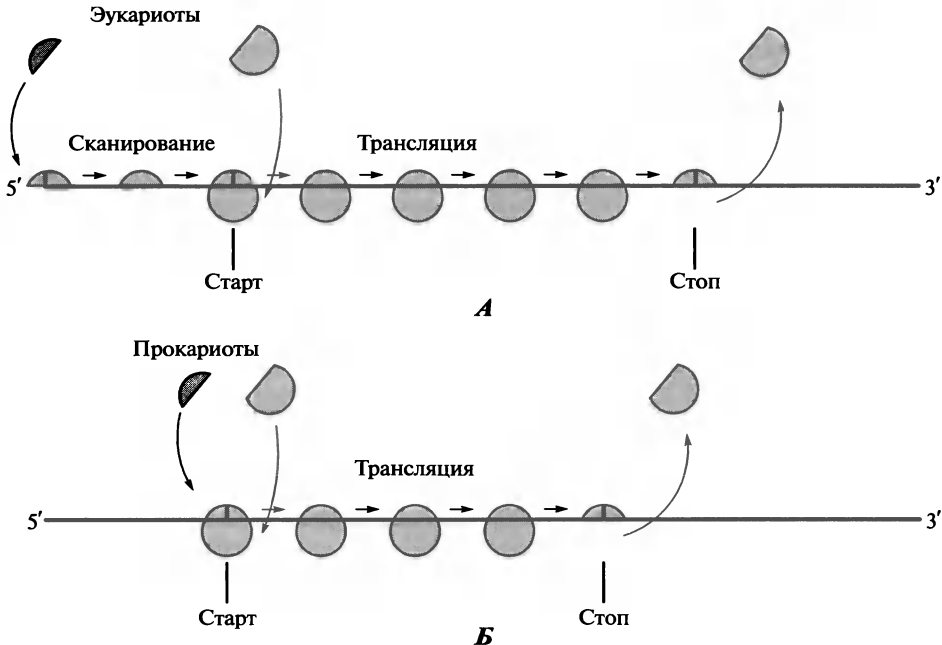


Рис. 14.1. Два основных способа инициации трансляции.

А: 5'-концевая инициация, свойственная эукариотам. Рибосомные частицы — 40S рибосомные субъединицы — связываются с мРНК на 5'-конце, далее сканируют ее 5'-нетранслируемую область (5'-НТО) вплоть до инициаторного кодона (как правило, AUG), где, объединяясь с 60S субъединицей, начинают трансляцию.

Б: внутренняя инициация, свойственная прокариотам. 30S рибосомные субъединицы связываются непосредственно со специальным рибосомосвязывающим участком (RBS), включающим инициаторный кодон, внутри цепи мРНК, объединяются с 50S субъединицами и с этого же места начинают трансляцию

участком связывания рибосомы (RBS, *Ribosome Binding Site*); 3) инициаторной аминоксил-тРНК; 4) группы белков, называемых факторами инициации (IF у прокариот или eIF у эукариот); 5) большой рибосомной субъединицы на финальном этапе инициации.

Для инициации трансляции необходима предварительная диссоциация рибосомы на субъединицы. Процесс инициации начинается малой субъединицей. Она имеет сродство к мРНК, инициаторной аминоксил-тРНК и белковым факторам инициации. Все эти компоненты организуются на малой субъединице до ее ассоциации с большой субъединицей.

Хотя малая рибосомная субъединица имеет сродство к любой полинуклеотидной последовательности, на мРНК существуют структурные элементы, преимущественно связывающиеся с рибосомной частицей. Эти элементы, называемые участками связывания с рибосомой (RBS, см. ранее), способны избирательно привлекать малые рибосомные субъединицы для инициации трансляции. В наиболее типичных случаях RBS включают в себя олигопуриновые последовательности Шайна — Дальгарно (в прокариотических мРНК), кэп-структуру с прилегающей последовательностью (в эукариотических мРНК) или специальные трехмерные структуры (IRES, см. подразд. 14.3.3) в мРНК пикорнавирусов и ряда других вирусных РНК. Кодон инициации обычно расположен непосредственно

в 3'-концевой части RBS. Преобладающим инициаторным кодоном как у прокариот, так и у эукариот является AUG. Близкие к нему триплеты, такие как GUG и UUG, в редких случаях — AUA, AUU, ACG, также могут функционировать в качестве инициаторных кодонов, особенно у прокариот, при условии, что RBS достаточно «сильный».

Инициаторная аминоксил-тРНК — это всегда специальная метионил-тРНК (Met-тРНК_f или Met-тРНК_i), которая не может участвовать в элонгации и не свя-

Таблица 14.1

Основные белковые факторы инициации трансляции

Обозначения (состав), размеры, кДа		Известные функции	Группы
у бактерий	у эукариот		
IF, 8	eIF1, 13	Структурная роль при дискриминации участка инициаторного кодона Структурная роль при фиксации инициаторного участка Образование тройственного комплекса с ГТФ и Met-tRNA _i Обмен ГДФ/ГТФ в комплексе с eIF2, регуляция использования eIF2 (с малой субъединицей не связан!)	I (белки, связывающиеся с малой рибосомной субъединицей)
	≅ eIF1A, 16		
	≠ eIF2 (αβγ), 130 [eIF2B (αβγδε), 270]		
IF2, 97			
IF3, 20	≠ eIF3(αβγδεξηθ), 550 (6 субъединиц у дрожжей, до 13 субъединиц у млекопитающих)	Взаимодействие с мРНК и мРНК-связывающими факторами	
	eIF4A (β), 46 eIF4B, 69 eIF4E (α), 25 eIF4F (αβγ), 270 eIF4G (γ), 176	РНК-хеликаза, АТФаза Связывание с мРНК, синергизм с eIF4A Связывание экзп-структуры Сумма функций eIF4A, eIF4E и eIF4G Образование комплекса с eIF4A и eIF4E, взаимодействие с eIF3 и РАРР	II (мРНК-связывающие белки)
	eIF5, 49 ≅ eIF5B, 139	Гидролиз eIF2-связанного ГТФ, ассоциация 40S и 60S субъединиц ГТФ-зависимое связывание с рибосомой, ассоциация 40S и 60S субъединиц	III (белки, участвующие в формировании 80S рибосом)

Примечание. Стрелкой и знаком ≅ обозначено наличие гомологии, значком ≠ — отсутствие гомологии.

зывается с EF1 (EF-Tu прокариот или eEF1A эукариот). У прокариот она формируется, превращаясь таким образом в формилметионил-тРНК (F-Met-тРНК). Метионин — универсальный стартовый аминокислотный остаток всех полипептидов и белков, синтезируемых рибосомами (у многих белков он в ходе трансляции удаляется аминопептидазами). Антикодоном инициаторной аминоксил-тРНК всегда является CAU; он полностью комплементарен основному инициаторному кодону AUG и частично комплементарен более редким кодам инициации. Наиболее важные особенности инициаторной аминоксил-тРНК состоят в том, что она не узнается фактором элонгации EF-Tu (или eEF1A) и имеет более сильное сродство к P-участку рибосомы, чем к A-участку. Перед взаимодействием с рибосомой она формирует тройственный комплекс с фактором инициации 2 (IF2 или eIF2) и ГТФ; именно в форме такого комплекса инициаторная аминоксил-тРНК связывается с малой рибосомной субъединицей в процессе инициации.

Помимо IF2 (или eIF2), малая рибосомная субъединица взаимодействует с двумя другими факторами инициации: IF1 и IF3 у прокариот или eIF1 + eIF1A и eIF3 у эукариот (табл. 14.1). IF3 (eIF3) предотвращает реассоциацию малой и большой субъединиц, поддерживая таким образом диссоциированное состояние, которое является компетентным к инициации. Имеются основания полагать, что все три перечисленных фактора инициации *in vivo* связываются с малой рибосомной субъединицей до ее взаимодействия с инициаторной аминоксил-тРНК и мРНК. Такой комплекс малой рибосомной субъединицы и факторов инициации может быть выделен из клеток и часто обозначается как «нативная» 30S или 40S субъединица в отличие от «производной» субъединицы, получаемой *in vitro* в результате диссоциации целой рибосомы. Роль факторов инициации, связанных с малой рибосомной субъединицей, состоит, в частности, в усилении дискриминации между инициаторной аминоксил-тРНК и всеми остальными — элонгаторными — аминоксил-тРНК, а также между RBS и другими структурами мРНК. Увеличение дискриминации может достигаться не только за счет избирательного участия факторов инициации в специфических позитивных взаимодействиях с инициаторной аминоксил-тРНК и RBS, но и путем индуцированного уменьшения сродства малой рибосомной субъединицы к элонгаторным аминоксил-тРНК и к неспецифическим последовательностям мРНК.

У эукариот, в дополнение к уже упомянутым *рибосомосвязывающим* факторам инициации, существует группа *мРНК-связывающих* факторов инициации. Эта группа включает в себя в первую очередь белки, обозначаемые как eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F и eIF4G. Они не имеют аналогов в клетках прокариот и вовлечены в подготовку цитоплазматической мРНК (ее 5'-НТО) к инициации.

Следует также отметить и группу эукариотических факторов инициации eIF5, которые участвуют в финальном этапе инициации — ассоциации инициаторного комплекса 40S субъединицы с большой (60S) рибосомной субъединицей и образовании транслирующей 80S рибосомы (см. табл. 14.1).

14.1.4. Этапы инициации

Как уже отмечалось ранее, диссоциация рибосомы на две субъединицы является необходимым условием инициации трансляции. Диссоциация рибосомы и сопутствующее ей присоединение соответствующих факторов инициации с формированием «нативной» 30S или 40S частицы может рассматриваться как первая

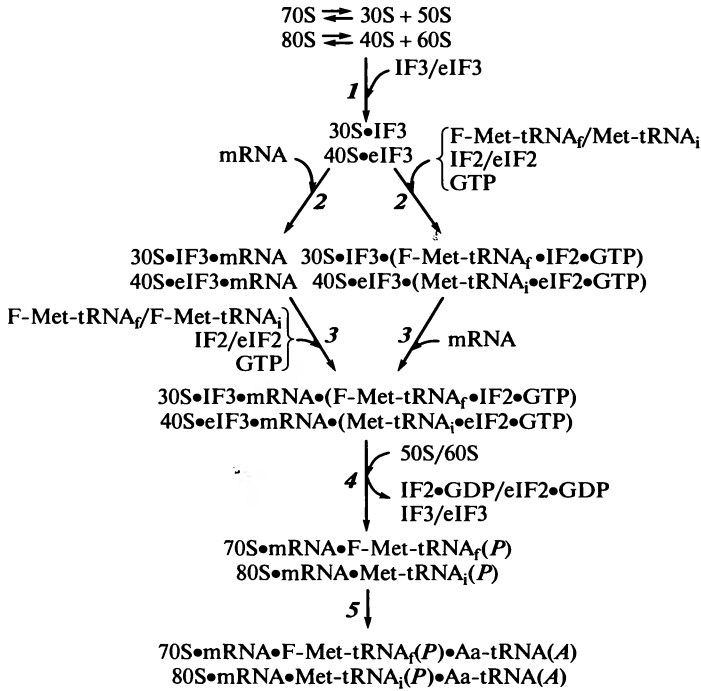


Рис. 14.2. Обобщенная схема последовательности событий в процессе инициации трансляции с двумя возможными альтернативными путями образования первичного инициаторного комплекса.

1: связывание малой рибосомной субъединицы с белковым фактором инициации IF3 или eIF3, в результате чего малая субъединица уходит из равновесной реакции ассоциации/диссоциации с большой субъединицей.

2: связывание малой рибосомной субъединицы (ее комплекса с IF3 или eIF3) либо с мРНК (левый путь), либо с инициаторной метионил-тРНК (правый путь).

3: связывание инициаторной метионил-тРНК с малой субъединицей, ассоциированной с мРНК (левый путь), либо связывание мРНК с метионил-тРНК-несущей малой субъединицей (правый путь). В обоих случаях результатом является формирование первичного инициаторного комплекса на базе малой рибосомной субъединицы.

4: взаимодействие большой рибосомной субъединицы с первичным инициаторным комплексом, освобождение факторов инициации и образование инициаторной 70S или 80S рибосомы, связанной с мРНК и несущей инициаторную метионил-тРНК в *P*-участке.

5: связывание первой элонгаторной аминоксил-тРНК с *A*-участком.

В целях большей ясности общей картины взаимодействия с рядом факторов инициации в ходе процесса опущены

стадия инициации (рис. 14.2). Таким образом, «нативная» малая рибосомная субъединица с IF3 (в случае прокариотической 30S субъединицы) или eIF3 (в случае эукариотической 40S субъединицы) начинает процесс инициации.

Следующей стадией инициации является ассоциация «нативной» малой субъединицы с мРНК. Связавшись с RBS на мРНК, рибосомная субъединица перемещается по полинуклеотидной цепи и находит участок инициации. У прокариот это перемещение осуществляется на короткие расстояния случайным образом (за счет одномерной диффузии вдоль цепи мРНК), а у эукариот — на значительные расстояния строго в направлении от 5'- к 3'-концу. Затем следует связывание инициаторной аминоксил-тРНК, определяющее окончательное расположение

комплекса (малой рибосомной субъединицы, факторов инициации и инициаторной аминоксил-тРНК) на инициаторном кодоне; это — третья стадия процесса инициации. Возможен также и альтернативный путь, когда на второй стадии происходит связывание инициаторной аминоксил-тРНК с малой рибосомной субъединицей, а затем следует стадия ассоциации этого комплекса с мРНК и поиск инициаторного кодона. В обоих случаях результатом является образование так называемого *рибосомного инициаторного комплекса* (см. рис. 14.2, 2 и 3). Он представляет собой комплекс $30S \bullet (IFs) \bullet F\text{-Met-tRNA} \bullet mRNA$ в случае прокариот (IFs — различные прокариотические факторы инициации) или комплекс $40S \bullet (eIFs) \bullet Met\text{-tRNA} \bullet mRNA$ в случае эукариот (eIFs — различные эукариотические факторы инициации).

Предпоследняя стадия (см. рис. 14.2, 4) — это взаимодействие большой рибосомной субъединицы с инициаторным комплексом. Взаимодействие сопровождается гидролитическим расщеплением ГТФ, связанного с IF2 (eIF2), и освобождением факторов инициации из комплекса с малой рибосомной субъединицей. Эта стадия завершается образованием полноразмерной 70S или 80S рибосомы, Р-участок которой содержит инициаторную аминоксил-тРНК, а А-участок свободен. У эукариот в реализации данной стадии принимают участие специальные белковые факторы (eIF5 и eIF5B) и ГТФ.

Последняя стадия инициации — связывание первой элонгаторной аминоксил-тРНК в А-участке и образование первой пептидной связи. Эта же стадия является началом элонгации.

14.2. Инициация у прокариот

14.2.1. Основные особенности прокариотической инициации

Инициация трансляции у прокариот характеризуется тремя главными чертами. Во-первых, в связи с отсутствием ядра, отделенного мембраной от цитоплазмы, процессы транскрипции и трансляции не отделены друг от друга в пространстве. Следовательно, новообразуемые цепи мРНК, еще будучи прикрепленными к РНК-полимеразному комплексу, доступны для взаимодействия с рибосомными частицами и компетентны для инициации трансляции. Таким образом, имеет место процесс *сопряженной транскрипции/трансляции* (рис. 14.3). Во-вторых, прокариотические гены обычно организованы в полицистронные опероны, которые транскрибируются как единое целое, образуя соответствующие полицистронные полирибонуклеотиды (*полицистронные мРНК*). На разных кодирующих последовательностях (цистромах мРНК) таких длинных полирибонуклеотидов инициация может происходить независимо по механизму *внутренней инициации* (см. рис. 14.1, Б). Более того, для обеспечения дифференциальной продуктивности различных кодирующих последовательностей у прокариот существует механизм дискриминации разных мРНК и разных цистронов в пределах одной и той же полицистронной мРНК (см. подразд. 15.2). Дискриминация основана на различном сродстве иницирующих рибосомных частиц к участку связывания с рибосомой (RBS) и приводит к различиям в скоростях инициации. В-третьих, прокариотическая мРНК взаимодействует с аппаратом инициации трансляции в форме свободных РНК, образованных в

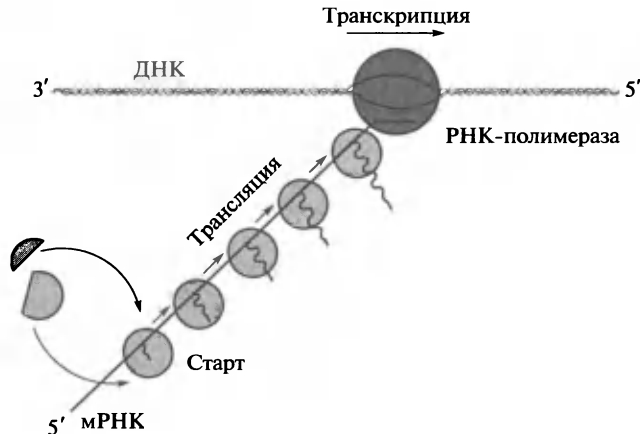


Рис. 14.3. Схема сопряженной транскрипции/трансляции у прокариот

результате самосворачивания полирибонуклеотидных цепей, имея таким образом, присущую ей вторичную и третичную структуры, в отличие от эукариотической мРНК, организованной в мРНК-частицы, в которых характер сворачивания РНК может быть сильно изменен РНК-связывающими белками. Соответственно характер взаимодействия компонентов системы инициации со свободной мРНК у прокариот существенно отличается от взаимодействий с мРНК-частицами, сильно нагруженными РНК-связывающими белками в случае эукариот.

14.2.2. Участок связывания с рибосомой на мРНК и кодон инициации

Для того чтобы свободная нетранслирующая рибосомная частица (30S субъединица) соединилась с участком мРНК, должен быть выполнен целый ряд структурных требований. Во-первых, этот участок не должен быть скрыт в стабильной вторичной или третичной структуре мРНК (хотя нестабильные шпильки часто входят в состав рибосомосвязывающих участков мРНК). В идеальном случае участок связывания с рибосомой (RBS) не должен содержать шпилек и компактно свернутых структур, т. е. должен быть *неструктурированным*.

Наиболее очевидная универсальная структурная черта RBS прокариотических мРНК — наличие полипуриновой нуклеотидной последовательности, так называемой последовательности Шайна — Дальгарно (1974), или SD, обычно отстоящей на расстояние от 5 до 12 нуклеотидов по направлению к 5'-концу от иницирующего кодона. Эта последовательность, предшествующая кодону инициации, в большей или меньшей степени комплементарна полипиримидиновому 3'-концевому участку 16S рРНК (...GAUACCUCUUAOH у *E. coli*), который иногда называют последовательностью «анти-Шайна — Дальгарно» (ASD). Количество комплементарных нуклеотидов колеблется в пределах от трех до девяти (чаще всего от четырех до шести). Последовательность CCUCCU 3'-концевого участка 16S рРНК (у *E. coli*) наиболее часто оказывается комплементарной (хотя, как правило, частично) полипуриновой последовательности, предшествующей инициаторному кодону на мРНК. Некоторые примеры приведены на рис. 14.4.

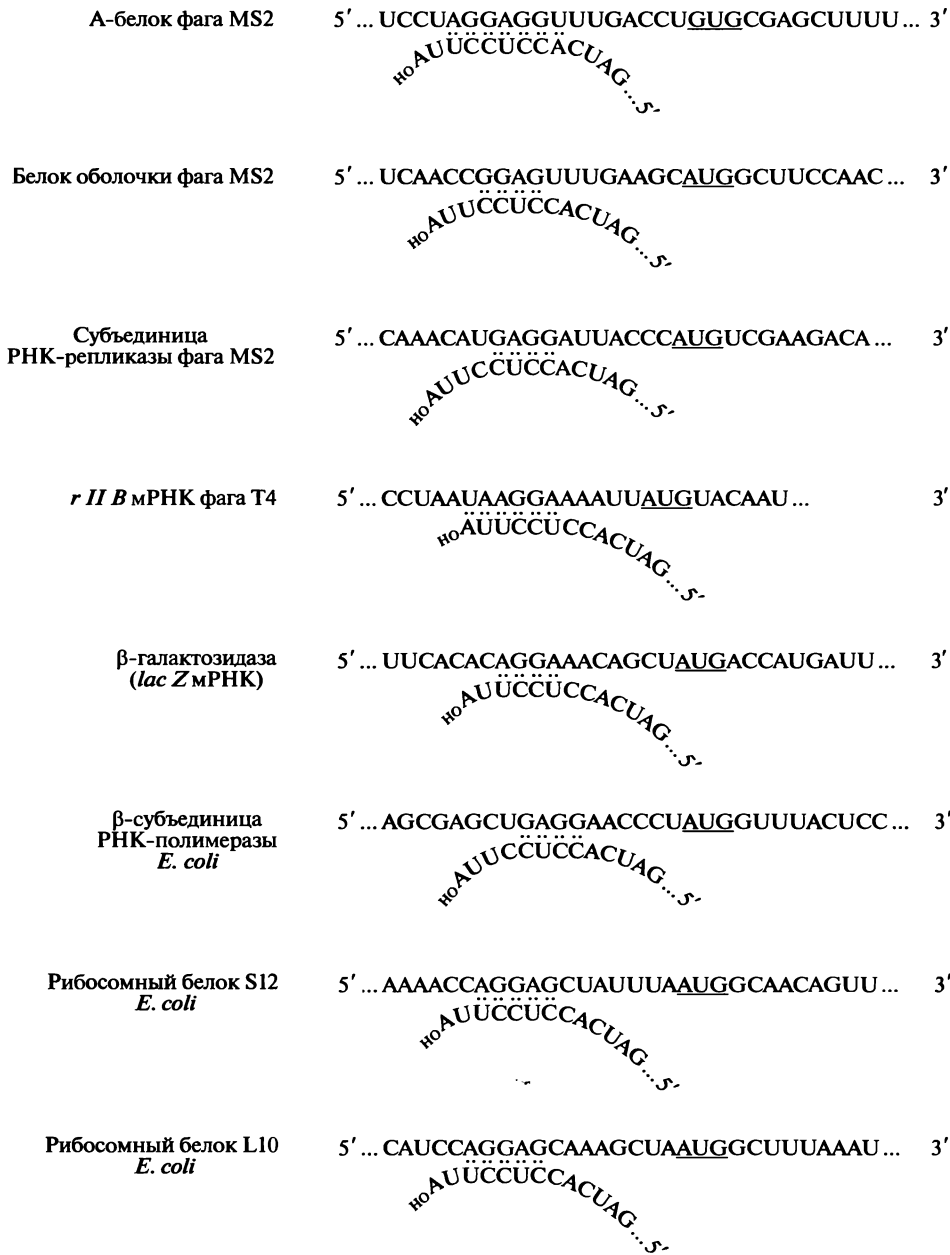


Рис. 14.4. Комплементарное спаривание 3'-концевого полипиримидинового тракта бактериальной 16S рРНК (нижние последовательности) с полипуриновой последовательностью — так называемой последовательностью Шайна—Дальгарно, предшествующей инициаторному кодону (подчеркнут) в бактериофаговых и бактериальных мРНК (верхние последовательности)

Комплементарное спаривание 3'-концевого участка 16S рРНК (ASD) с последовательностью Шайна—Дальгарно прямо участвует в ассоциации иницирующей рибосомной 30S субъединицы с участком RBS на мРНК.

Необходимо отметить, однако, что инициация трансляция возможна и в случаях мРНК, не содержащих последовательности Шайна — Дальгарно. Например, мРНК, кодирующая репрессор *cI* фага λ , лишена такой последовательности перед инициаторным кодоном; однако инициация, хотя и не очень эффективная, имеет место. Среди бактериальных (*E. coli*) транскриптов генов около 2—3 % предполагаемых матриц не имеют последовательности Шайна — Дальгарно в явном виде. Также бактериальные рибосомы могут осуществлять инициацию *in vitro* на некоторых эукариотических мРНК, не содержащих последовательности Шайна — Дальгарно. Отсюда можно заключить, что последовательность Шайна — Дальгарно, безусловно, вносит важный вклад в эффективную ассоциацию рибосомных частиц с матрицей, но ее наличие не является для этого абсолютно необходимым условием.

В случае бактериальной полицистронной мРНК рибосома после терминации на предыдущем цистроне может перейти в нетранслирующее состояние и диссоциировать на субъединицы, однако 30S субъединица может оставаться связанной с мРНК на некоторое время. Затем она либо освобождается из комплекса с мРНК, либо «проскальзывает» межцистронный участок и иницирует трансляцию на следующем цистроне (см. подразд. 15.3). Вероятность такой реинициации без диссоциации 30S субъединицы от мРНК тем выше, чем короче и менее структурирован межцистронный участок. Если рибосомная частица переходит от терминации на предыдущем цистроне непосредственно к инициации на последующем без диссоциации из комплекса с мРНК, то последовательность Шайна — Дальгарно не так необходима для реинициации. В целом терминация на предшествующем цистроне может сильно увеличивать эффективность последующей инициации (реинициации). Во многих случаях независимая инициация *de novo* (свободными рибосомами) на внутреннем цистроне со слабой последовательностью Шайна — Дальгарно (т.е. при неполной комплементарности SD и ASD) неэффективна, тогда как реинициация, следующая за терминацией на предыдущем цистроне, происходит с высокой эффективностью (*трансляционное сопряжение*, см. подразд. 15.3).

Как уже отмечалось ранее, наиболее часто используется инициаторный кодон AUG. В то же время у *E. coli* около 10 % от общего количества матриц в качестве стартового кодона имеют GUG, а около 1 % — UUG. У типичной грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* GUG и UUG составляют 30 % иницирующих кодонов, причем UUG встречается даже чаще, чем GUG. В исключительных случаях в клетках бактерий инициация начинается с триплетов AUU, AUA, ACG и CUG. Эти редкие инициаторные кодоны — «слабые» и, вероятно, могут выполнять свою функцию только в комбинации с «сильными» последовательностями Шайна — Дальгарно и/или другими структурными элементами, способствующими инициации.

В добавление к последовательности Шайна — Дальгарно и кодону инициации участок связывания с рибосомой прокариотической мРНК может содержать структурные элементы, усиливающие инициацию, которые могут быть расположены как по направлению к 5'-, так и к 3'-концу от точки начала трансляции. В целом общая длина RBS может составлять около 55—60 нуклеотидов, от положения около -35 до положения +20 относительно первого нуклеотида инициаторного кодона. Другими словами, последовательности, окружающие SD и кодон инициации, не являются случайными и также содержат информацию, необходимую для эффективной инициации трансляции. В частности, нуклеотиды А и U преобладают

на всем протяжении RBS, и А особенно предпочтителен на участке непосредственно после последовательности Шайна — Дальгарно. Напротив, С встречается в RBS сравнительно редко. На основании имеющихся данных можно сделать заключение о некоторых оптимальных последовательностях RBS. Например, было отмечено частое расположение А в позиции -3; кодонов GCU и AAA непосредственно после инициаторного кодона, часто с А в качестве следующего за ними нуклеотида; последовательности UUAA в составе четвертого и пятого кодонов.

Неоднократно отмечалось, что участок, расположенный перед последовательностью Шайна — Дальгарно, особенно важен для эффективной инициации. Прежде всего, он не должен быть структурирован; только в этом случае он способен обеспечивать некоторые необходимые контакты с иницирующей рибосомной частицей. В такие стимулирующие контакты могут быть вовлечены до 20 — 30 нуклеотидов перед первым остатком последовательности Шайна — Дальгарно. Хорошо известна усиливающая последовательность, расположенная по направлению к 5'-концу от последовательности Шайна — Дальгарно, — так называемый эпсилон-мотив UUUAACUUUA высокоэкспрессируемых поздних мРНК бактериофага T7 и некоторых других фагов, так же как и эпсилон-подобные последовательности некоторых бактериальных мРНК (например, UUUUAACU и UAAUUUAC в высокоэкспрессируемом цистроне *atpE* полицистронной *atp* мРНК у *E. coli*, см. подразд. 15.2). Интересно, что рассматриваемые 5'-проксимальные усилители («энхансеры») инициации трансляции не обязательно должны примыкать к участку Шайна — Дальгарно: они могут быть отделены от него структурированным районом — например, стабильной шпилькой, которая сама не связывается с рибосомой («выплетливается» из нее, как в случае мРНК, кодирующей треонил-тРНК-синтетазу — см. подразд. 15.4.3) и, таким образом, не входит в состав RBS.

В то время как последовательность Шайна — Дальгарно в составе мРНК комплементарно связывается с 3'-концевой последовательностью 16S рРНК, образуя с ней двойную спираль, другие участки RBS, по всей видимости, также взаимодействуют с рибосомной РНК 30S субъединицы. Так, согласно экспериментам с использованием короткой химической сшивки, участок между последовательностью Шайна — Дальгарно и инициаторным кодоном находится в контакте с нуклеотидами A665 в боковой петле спирали h22 (домен II), A1360 в концевой петле спирали h43 (домен III) и G1530 около основания последней (3'-проксимальной) спирали h45 16S рРНК (см. рис. 8.13). Все эти позиции расположены в участках вторичной структуры, соседних с мРНК- и тРНК-связывающими участками рибосомы (см. подразд. 8.2 и 8.5) и являющихся универсально консервативными во всех рибосомах, включая эукариотические. В дополнение к основаниям в районе последовательности Шайна — Дальгарно было показано, что основания мРНК, находящиеся на расстоянии 10 и 20 — 21 нуклеотидов по направлению к 5'-концу матрицы от SD, также могут быть защищены от химических модификаций вследствие взаимодействия с рибосомой (вероятно, с 16S рРНК).

Участок RBS, расположенный за стартовым кодоном, однако, не имеет таких контактов с 16S рРНК до тех пор, пока не происходит связывания инициаторной тРНК. Только после связывания F-Met-тРНК эти участки RBS становятся защищенными от гидроксильной атаки сахарофосфатного остова; возможность химической сшивки с 16S рРНК приобретает также исключительно после связывания инициаторной тРНК. Все участки 16S рРНК, способные химически сшиваться с этим районом RBS, расположены в мРНК-связывающей щели 30S субъединицы; это участок C1395 — C1402 в секции между доменом III и длинной

составной шпилькой (спираль h44) 3'-концевой последовательности, A532 в конечной петле спирали h18 (домен I) и U1052 в спирали h34 (домен III) (см. подразд. 8.2). Тот факт, что специфические контакты участка RBS, расположенного за стартовым кодоном, с мРНК-связывающей щелью устанавливаются только после связывания F-Met-тРНК, показывает, что мРНК, удерживаемая 30S субъединицей до ее фиксации кодон-антикодоновым взаимодействием, довольно подвижна; вероятно, когда она связана только с ASD рибосомы, она способна относительно свободно «болтаться» на рибосоме благодаря гибкости одноцепочечного 3'-концевого участка 16S рРНК («состояние ожидания» — «*stand-by complex*»).

14.2.3. Прокариотическая инициаторная тРНК

Инициаторный кодон прокариотических мРНК распознается молекулой формилметионил-тРНК (F-Met-тРНК) с антикодоном CAU. Таким образом, кодон-антикодоновое спаривание во время инициации может быть либо полностью комплементарным (в случае стандартного иницирующего кодона AUG), либо частично комплементарным (два из трех нуклеотидов в случаях редких иницирующих кодонов). Нестрогое соответствие в первом положении кодона инициации (GUG или UUG) является наиболее «разрешенным» среди частично комплементарных. (Необходимо принять во внимание, что в данном случае нестрогое соответствие принципиально отличается от криковского нестрогости соответствия — «*wobbling*» — в третьей позиции кодонов во время элонгации.)

Инициаторная тРНК по своей структуре подобна элонгаторным тРНК: вторичная структура может быть представлена как типичная укладка типа «клеверного листа» (рис. 14.5), и шпильки организованы в L-образную структуру (см. рис. 3.6), что приводит к формированию компактной молекулы с антикодоновым и акцепторным выступами, как и в случае парадигматической дрожжевой тРНК^{Phe} (см. рис. 3.7 и 3.1 цв. вкл.). Однако имеющиеся небольшие структурные различия оказываются принципиально важными для функционирования инициаторной тРНК. Во-первых, 5'-концевой нуклеотидный остаток инициаторной тРНК не образует уотсон-криковскую пару с 72-м нуклеотидным остатком 3'-концевого участка (см. рис. 14.5). Это обеспечивает повышенную гибкость акцепторного конца; согласно кристаллографической модели, 3'-конец тРНК^{fMet} загибается по направлению к 5'-концу и не продолжает спиральную организацию акцепторного стебля, как в случае элонгаторных тРНК. Таким образом, остаток формилметионина может лежать на спирали акцепторного стебля и содействовать специфическому узнаванию F-Met-тРНК белком IF2.

Во-вторых, структура антикодоновой петли инициаторной тРНК^{fMet} обнаруживает отклонения от классической конформации дрожжевой тРНК^{Phe}: инвариантный U в позиции 33 по соседству с антикодоном со стороны 5'-конца повернут наружу (в то время как этот же остаток элонгаторной тРНК повернут внутрь и расположен напротив фосфата третьего остатка антикодона, см. рис. 3.7). Поэтому стопкоподобная конформация антикодона инициаторной тРНК оказывается несколько искаженной по сравнению с антикодоном элонгаторной тРНК. Уникальное наличие стопки трех последовательно расположенных пар оснований G:C в конце антикодоновой спирали (см. рис. 14.5) во всех инициаторных тРНК,

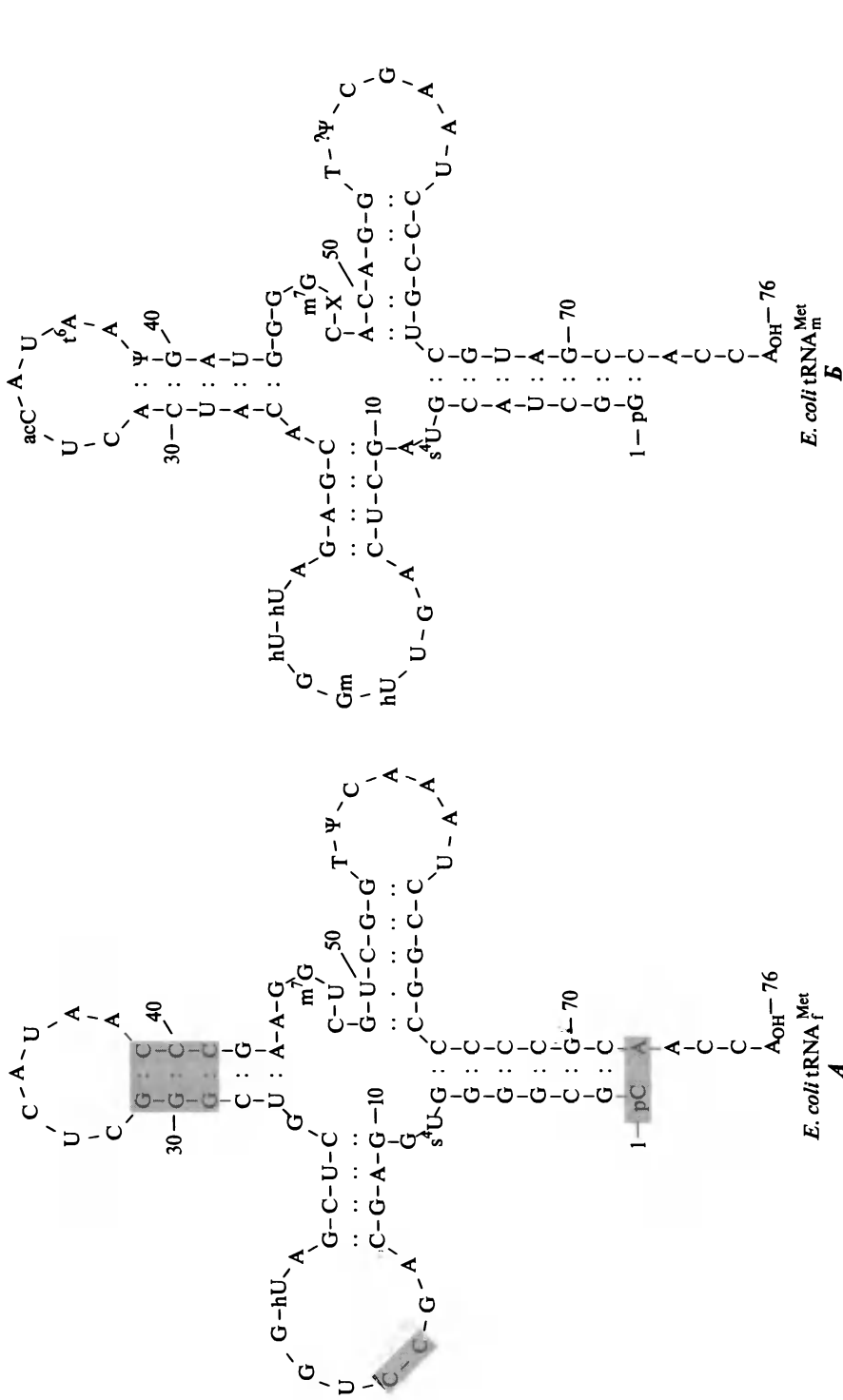


Рис. 14.5. Нуклеотидная последовательность и схема вторичной структуры бактериальной инициаторной метиониновой тРНК (А) в сравнении с бактериальной элонгаторной метиониновой тРНК (Б).

В инициаторной тРНК отмечены (серым фоном) ее характерные особенности — неспаренный 5'-концевой нуклеотидный остаток, уникальный дуплет CC в D-петле и три последовательные пары G:C в спирали антикодонной шпильки.

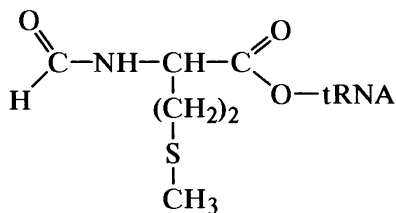
Dube et al. (1968) *Nature* 218: 232–233. Cory et al. (1968) *Nature* 220: 1039–1040

по-видимому, также вносит свой вклад в необычную конформацию их антикодоновой петли.

В-третьих, нуклеотидные остатки в дигидроуридиловой петле инициаторной тРНК (положения 16 и 17) более компактно упакованы друг с другом и с ядром тРНК по сравнению с элонгаторными тРНК, в которых они рыхло выступают из L-образной молекулы.

Отмеченные различия могут иметь отношение к специфическим функциональным особенностям инициаторной тРНК: она узнается метионил-тРНК-трансформилазой (см. далее); она не узнается фактором EF-Tu (в аминоацилированной форме), но вместо этого связывается с фактором IF2 (см. далее); она изначально устанавливается в P-участке, но не в A-участке 70S рибосомы.

Инициаторная тРНК имеет специфическое сродство к обычной метионил-тРНК-синтетазе и соответственно способна акцептировать только метионин. Следовательно, с помощью одной и той же аминоацил-тРНК-синтетазы ацилируются метионином два вида тРНК^{Met}: элонгаторная тРНК, узнающая кодон AUG в процессе элонгации, и инициаторная тРНК, которая может узнавать триплет AUG, так же как и GUG и UUG (реже — AUU, AUA и т.д.) в процессе инициации. В отличие от обычной (элонгаторной) Met-тРНК инициаторная Met-тРНК служит субстратом для специфической формилтрансферазы, которая переносит формильную группу от формилтетрагидроfolата на аминогруппу остатка метионина, образуя тем самым формилметионил-тРНК:



Неспаренный конец и обусловленные им конформационные особенности, скорее всего, необходимы для узнавания Met-тРНК_f метионил-тРНК-формилтрансферазой. В то же время формилирование аминогруппы предотвращает взаимодействие с EF-Tu. Однако EF-Tu весьма слабо взаимодействует и с неформилированной инициаторной Met-тРНК_f, указывая на присутствие в этой тРНК структурного элемента, также затрудняющего взаимодействие с EF-Tu. Таким элементом может быть измененная область контакта между T- и D-петлями. Искаженная структура антикодоновой петли может иметь значение для первичного связывания F-Met-тРНК в P-участке и для необычных нестрого комплементарных («wobbling») взаимодействий антикодона с целым рядом различных инициаторных кодонов.

Инициаторная тРНК_f^{Met} в аминоацилированной и формилированной форме (F-Met-тРНК) играет ключевую роль в инициации. Соответственно первым аминокислотным остатком любой синтезируемой прокариотической рибосомой полипептидной цепи всегда становится формилметионин.

Во время последующей элонгации формильный остаток отщепляется с помощью формилазы. Первый метиониновый остаток тоже часто (но не всегда) ко-трансляционно отрезается от растущей полипептидной цепи специальной аминопептидазой.

14.2.4. Прокариотические факторы инициации

Для инициации трансляции в прокариотических системах необходимы три белка — факторы инициации IF1, IF2 и IF3 (табл. 14.1). Все они имеют родство к 30S рибосомной субъединице. Вероятно, в условиях *in vivo* они в основном захватываются свободными 30S субъединицами; таким образом формируются «нативные» 30S частицы, которые способны начинать инициацию.

IF1 представляет собой небольшой белок основного характера молекулярной массой 8 кДа (71 аминокислотный остаток у *E. coli*). Этот фактор, скорее всего, является вспомогательным белком, принимающим участие в диссоциации и ассоциации рибосомы на ранней и поздней стадиях инициации соответственно и в стабилизации надлежащих взаимодействий 30S субъединицы с F-Met-тРНК и остальными факторами инициации. У некоторых бактерий IF1 не обнаружен. На молекулярном уровне связывание IF1 с 30S субъединицей вызывает выпетливание функционально важных A1492 и A1493 из длинной спирали h44 16S рРНК и их погружение в белок (IF1), а также некоторое изменение самой указанной спирали, что в целом приводит к блокаде A-участка. Действительно, показано, что на функциональной поверхности 30S субъединицы (контактирующей с 50S субъединицей в полной 70S рибосоме) IF1 располагается непосредственно в районе A-участка (рис. 14.6). Таким образом, фактор способствует избирательности попадания инициаторной тРНК непосредственно в P-участок. В результате связывания IF1 происходит также, по-видимому, конформационное изменение рибосомной 30S субъединицы в районе «шеи», приводящее к более «открытому» (разомкнутому) состоянию тРНК-связывающего участка и стабилизации переходного состояния в процессах диссоциации и ассоциации рибосомных субъединиц.

IF2 — это крупный кислый белок, имеющий в своем составе ГТФ-связывающий домен, гомологичный таковому у белков EF-G и EF-Tu. IF2 был выделен из клеток *E. coli* в трех изоформах, различающихся длиной N-концевого домена. Они синтезируются на одной и той же мРНК в результате трансляции, стартующей с альтернативных инициаторных кодонов в пределах 5'-проксимальной кодирующей последовательности. Молекулярная масса полноразмерного IF2 — 97 кДа (889 аминокислотных остатков), а наиболее укороченной изоформы — 80 кДа (732 аминокислотных остатка). Все три изоформы белка, по всей видимости, функционируют в инициации одинаковым образом. IF2 — главный фактор инициации, ответственный за ГТФ-зависимое связывание F-Met-тРНК с 30S рибосомной частицей и за ГТФазную активность, индуцируемую рибосомой в процессе связывания инициаторного 30S комплекса с 50S субъединицей. В узнавание F-Met-тРНК белком IF2 вовлечены ТΨ-петля и ТΨ-стебель тРНК, т.е. левая сторона L-образной молекулы тРНК,

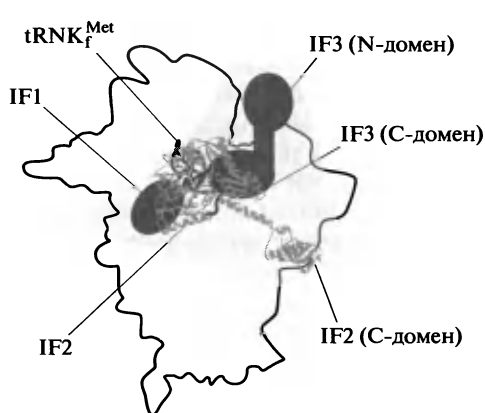


Рис. 14.6. Схема расположения бактериальных факторов инициации на контактирующей стороне 30S рибосомной субъединицы.

Адаптировано из P. makrishnan (2002) *Cell* 108: 557—572

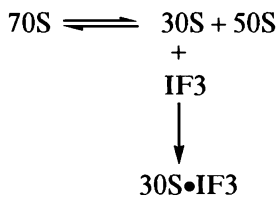
если смотреть с внешней стороны стороны угла, когда антикодон направлен вверх. На основании ряда данных можно заключить, что устанавливая инициаторную тРНК в *P*-участок, сам IF2 ложится поверх фактора IF1 на район *A*-участка 30S субъединицы (см. рис. 14.6), в то время как его ГТФазный домен «свисает», чтобы затем взаимодействовать с факторсвязывающим центром на 50S субъединице.

IF3 — белок слегка основного характера молекулярной массой около 20 кДа (181 аминокислотный остаток у *E. coli*). Будучи связанным с 30S субъединицей, он предотвращает ее реассоциацию с 50S субъединицей. Как компонент иницирующей «нативной» 30S субъединицы IF3 вносит свой вклад в связывание ее с IF2 и мРНК, а также, что более важно, в избирательное связывание инициаторной тРНК (в комплексе с IF2 GTP); существуют данные о дестабилизирующем воздействии IF3 на комплексы элонгаторных тРНК с 30S субъединицей (т. е. «неправильные» комплексы). В структурном отношении этот белок весьма интересен: он имеет гантелевидную форму и состоит из двух независимых компактных α/β -доменов, соединенных длинной α -спиралью. Два экспонированных β -слоя двух доменов разделены расстоянием 45 Å и взаимодействуют с двумя отдаленными районами 16S рРНК 30S рибосомной субъединицы. С-концевой домен IF3 связывается с 16S рРНК на границе боковой лопасти («платформы») с телом 30S субъединицы, в области межсубъединичного контакта с 50S субъединицей, что объясняет диссоциирующий эффект фактора на рибосому. N-концевой домен располагается тоже на боковой лопасти 30S субъединицы, но с края, соседствуя с белками S7 и S11, и, по-видимому, прикрывает *E*-участок (см. рис. 14.6). Функция дискриминации (ослабления связывания) элонгаторных тРНК, скорее всего, обусловлена воздействием С-домена IF3 на *P*-участок или на саму тРНК в *P*-участке.

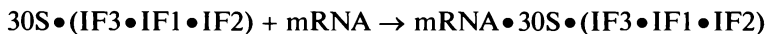
Таким образом, в целом можно представить следующую картину взаимодействий факторов инициации со свободной 30S субъединицей: IF1 связывается в районе *A*-участка, IF2 ложится поверх *A*-участка, а IF3 занимает район, примыкающий к *E*-участку (см. рис. 14.6). Так как все три фактора оказываются связанными на контактирующей стороне субъединицы, то понятно, что эти белки должны диссоциировать из инициаторного 30S комплекса при формировании 70S рибосомы.

14.2.5. Последовательность событий инициации трансляции

Этап 1. Диссоциация нетранслирующих (терминирующих) 70S рибосом на 30S и 50S субъединицы (см. подразд. 13.6) предшествует инициации трансляции во всех случаях. При физиологических условиях нетранслирующие рибосомы по всей вероятности находятся в состоянии обратимого равновесия со своими отдельными субъединицами. IF1 может ускорить процесс диссоциации-ассоциации, в то время как IF3 связывается с 30S субъединицами и нарушает состояние равновесия:

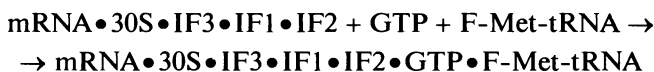


Этап 2. 30S рибосомные субъединицы в комплексе с IF3 или со всеми тремя факторами инициации («нативные» 30S частицы) могут связываться с участком инициации, или участком связывания с рибосомой RBS, на мРНК. Этот участок может быть расположен вблизи 5'-конца или далеко от него; в случае полицистронной мРНК возможно существование нескольких таких участков на протяжении цепи. Важно, чтобы этот участок мРНК был доступен для взаимодействия с рибосомной частицей, содержал полипуриновую последовательность Шайна — Дальгарно (SD) и на должном расстоянии за ней — триплет инициации (предпочтительно AUG). В отсутствие факторов инициации 30S рибосомная субъединица также способна распознавать участок RBS на мРНК, но факторы существенно усиливают взаимодействие и делают его гораздо более избирательным:

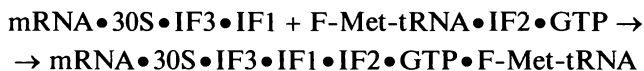


Связанная в этом комплексе мРНК удерживается в основном взаимодействием SD:ASD и еще не установлена полностью и должным образом в мРНК-связывающей щели 30S субъединицы («состояние ожидания»).

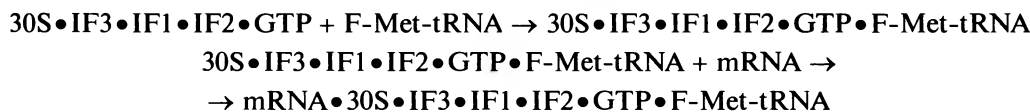
Этап 3. На этом этапе в соответствии с классическим сценарием, описанным ранее, F-Met-тРНК связывается с комплексом mRNA•30S. Это связывание ГТФ-зависимо и опосредовано IF2. Если IF2 уже находится на 30S частице, он активируется с помощью ГТФ, таким образом приобретая сродство к F-Met-тРНК, и F-Met-тРНК присоединяется к комплексу:



Имеются веские основания считать, что кодон-антикодонное взаимодействие инициаторного триплета мРНК и связанной F-Met-тРНК_i^{Met} окончательно устанавливает мРНК в мРНК-связывающем участке 30S рибосомной субъединицы (см. подразд. 8.2). Если свободный IF2 с ГТФ случайно сталкивается с F-Met-тРНК в растворе, они сначала образуют тройственный комплекс IF2•GTP•F-Met-tRNA, который затем связывается с комплексом mRNA•30S:



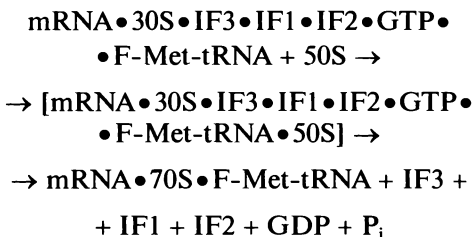
Также может обсуждаться и альтернативный путь, когда «нативная» 30S частица с факторами инициации сначала связывает F-Met-тРНК, а затем сформированный комплекс взаимодействует с RBS на мРНК:



В любом случае именно антикодон F-Met-тРНК, связанной на 30S субъединице, фиксируется на инициаторном кодоне, расположенном за полипуриновой последовательностью, и тем самым устанавливает рибосомную частицу точно на начало кодирующей последовательности.

Этап 4. Теперь инициаторный 30S комплекс готов объединиться с 50S рибосомной субъединицей. Факторы инициации, естественно, должны освобождаться из комплекса сопряженно с ассоциацией субъединиц. Факторсвязывающий участок 50S субъединицы взаимодействует с IF2 и индуцирует ГТФазную актив-

ность этого фактора. ГТФ гидролизует, что приводит к потере белком IF2 свойства к F-Met-тРНК и к рибосоме. Меньше известно о моменте и механизме освобождения двух других факторов инициации. Так или иначе, 70S частица с инициаторной F-Met-тРНК в *P*-участке формируется непосредственно на инициаторном кодоне мРНК:



Этап 5. Инициаторный 70S комплекс, сформированный в предыдущей реакции, содержит вакантный *A*-участок с установленным в нем кодоном, следующим непосредственно за инициаторным кодоном. *P*-участок занят инициаторной F-Met-тРНК — аналогом пептидил-тРНК. Таким образом, 70S комплекс компетентен к принятию первой элонгаторной аминоксил-тРНК (Aa-tRNA_e) в свой вакантный *A*-участок и осуществляет формирование первой пептидной связи между двумя субстратами: инициаторной F-Met-тРНК и первой элонгаторной аминоксил-тРНК.

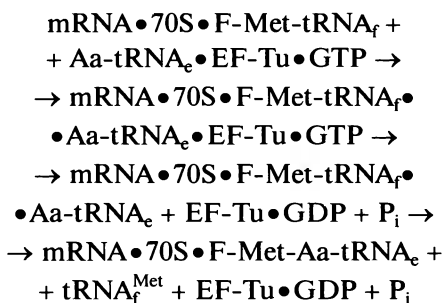
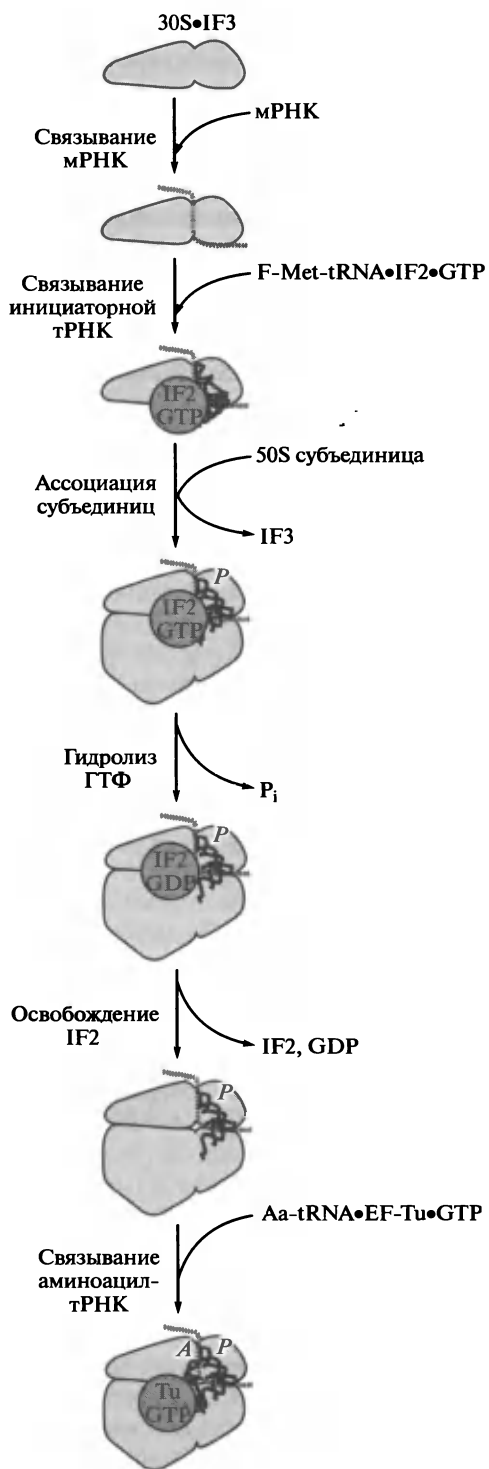


Рис. 14.7. Схема последовательности событий в процессе инициации трансляции у прокариот (зубактерий)



На этом инициация завершается, и начинается элонгация. На рис. 14.7 схематически представлена последовательность событий в процессе прокариотической инициации трансляции.

14.3. Инициация у эукариот

14.3.1. Особенности эукариотических мРНК

Эукариотическая мРНК синтезируется в ядре в виде предшественника — пре-мРНК. С самого начала она находится в комплексе с большим количеством белков. Ядерные пре-мРНК-белковые комплексы превращаются в мРНК-белковые комплексы (мРНП), которые транспортируются через ядерную мембрану. Во время транспорта из ядра в цитоплазму белковый состав мРНП сильно меняется. Весовое соотношение белка и мРНК в цитоплазматических мРНП, еще не участвующих в трансляции, составляет около 4:1. В процессе инициации трансляции и во время элонгации мРНП связывается с рибосомами и теряет часть белков. Тем не менее даже мРНК, транслируемая рибосомами в составе полирибосом, все еще удерживает значительное количество белков (весовое соотношение белка и мРНК становится около 2:1). Таким образом, все эукариотические мРНК на любой стадии своего существования представлены в виде мРНП (см. подразд. 2.4). Это — наиболее характерная особенность эукариотических мРНК.

Из вышесказанного следует, что эукариотический аппарат инициации вступает во взаимодействие не просто с мРНК, а с мРНП. В связи с этим три важных обстоятельства необходимо учитывать при рассмотрении процесса инициации у эукариот. Во-первых, вторичные и третичные структуры мРНК могут быть значительно изменены белками, входящими в состав мРНП: с одной стороны, известно, что некоторые мРНК-связывающие белки могут «плавить» структуру мРНК; с другой стороны, локальные шпильки и элементы третичной структуры могут быть стабилизированы белками. Во-вторых, возможна прямая конкуренция между белками мРНП и мРНК-связывающими факторами инициации. В-третьих, структурная организация (четвертичная структура) мРНП может модулировать доступность мРНК для участников процесса инициации, таких как рибосомы и факторы инициации.

В цитоплазме мРНК существует в основном в двух формах: нетранслируемые мРНП-частицы и транслирующие полирибосомы. Поэтому процесс инициации может происходить по-разному в зависимости от того, приходится ли рибосомным частицам и факторам инициации взаимодействовать с мРНП и начинать трансляцию на «девственной» мРНК, или они связываются с уже транслируемой мРНК вслед за рибосомами, ранее инициировавшими трансляцию. Также у эукариот наблюдается явление «циркуляризации» полирибосом, и поскольку в таких циклических полирибосомах участок терминции оказывается пространственно сближен с участком инициации, то рибосомы после терминции могут реиницировать трансляцию той же самой мРНК без их диссоциации от матрицы (так называемая «трансляция по кругу», см. подразд. 14.3.9).

Необходимо также принять во внимание другие черты, характерные для большинства эукариотических мРНК. Во-первых, эукариотические мРНК в большин-

стве своем моноцитронны. Во-вторых, как правило, они несут кэп-модификацию на своем 5'-конце. В-третьих, многие эукариотические мРНК характеризуются длинными 3'-нетранслируемыми областями — 3'-НТО (3'-*untranslated regions*, 3'-UTR), иногда сравнимыми по длине с кодирующей последовательностью. Наконец, подавляющее большинство мРНК в цитоплазме эукариотических клеток полиаденилированы на 3'-конце. Все эти особенности также очень существенны для механизмов инициации и ее регуляции.

Преобладающий способ инициации трансляции у эукариот — 5'-концевая кэп-зависимая инициация, и эукариотические мРНК не содержат последовательности типа Шайна—Дальгарно перед своими кодонами инициации. Как правило, комплементарность между 3'-концом РНК малой рибосомной субъединицы и последовательностями мРНК, предшествующими старту трансляции, отсутствует в отличие от ситуации в прокариотических организмах. При этом замечательно, что 3'-концевые 40-нуклеотидные «хвосты» РНК малой рибосомной субъединицы (как 16S рРНК прокариот, так и 18S рРНК эукариот) эволюционно консервативны и показывают высокую степень гомологии, формируя похожую шпильчатую структуру. Однако полипиримидиновый блок CCUCS прокариотических 16S рРНК (так называемая последовательность «анти-Шайна—Дальгарно») отсутствует в эукариотических 18S рРНК (рис. 14.8). Можно предположить, что по каким-то важным причинам эукариотам пришлось избавиться от комплементарного узнавания рибосомной РНК и мРНК в процессе первоначальной ассоциации рибосом с матрицей и приобрести другой способ узнавания инициаторной последовательности, включающий в себя первичную ассоциацию с 5'-концом мРНК. (Это рассуждение, однако, может быть повернуто и наоборот: возможно, узнава-

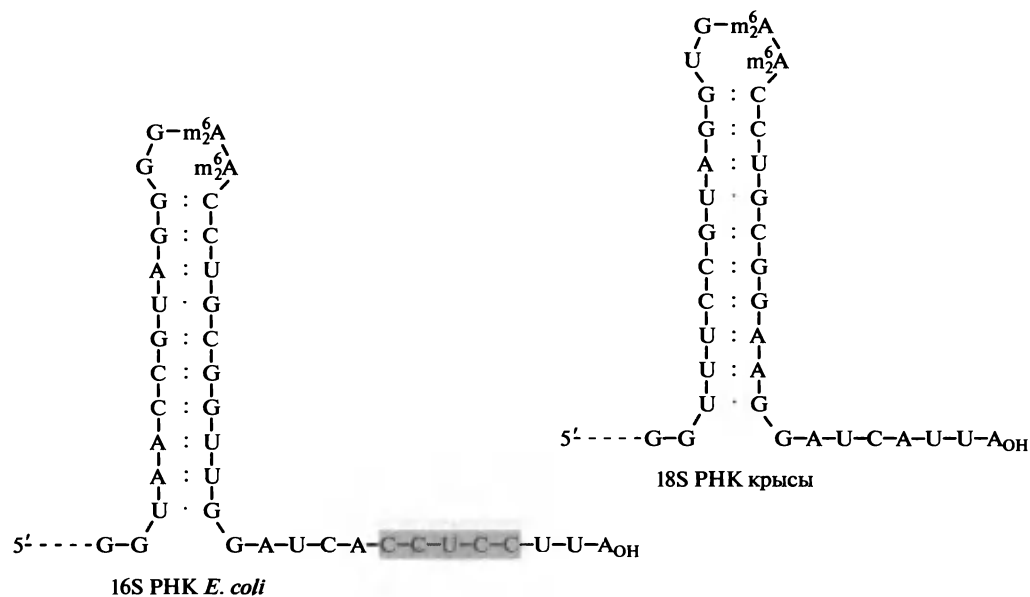


Рис. 14.8. Сравнение нуклеотидных последовательностей и вторичной структуры 3'-концевых участков бактериальной 16S рРНК (шпилька h45) и эукариотической 18S рРНК.

Пентануклеотидная «вставка» («антипоследовательность Шайна—Дальгарно», ASD) в бактериальной 16S рРНК выделена серым фоном

ние 5'-конца является более древним механизмом, и эволюция прокариот, а особенно эволюция оперонов и полицистронных матриц, могла привести к появлению специальных механизмов узнавания внутренних участков инициации; тогда спаривание полипуриновой последовательности Шайна — Дальгарно с приобретенной в процессе эволюции вставкой CCUCC около 3'-конца 16S рРНК представляет собой часть этого нового механизма.)

14.3.2. Кэп-структура и инициаторные кодоны

Кэп-структура (см. рис. 2.4) добавляется на 5'-конец эукариотических мРНК во время синтеза и созревания («процессинга») пре-мРНК в ядре. Кэп-структура играет очень важную роль в инициации трансляции. Именно она вовлекает факторы инициации и рибосомы в механизм 5'-концевой инициации (см. рис. 14.1).

Вслед за кэп-структурой на мРНК располагается 5'-нетранслируемая область (5'-НТО). Обычно 5'-НТО эукариотических мРНК не очень длинные, порядка нескольких десятков нуклеотидов, хотя имеется множество исключений. Кэп и примыкающая к нему 5'-НТО могут рассматриваться как участок связывания с рибосомой (RBS), на котором образуется первичный комплекс с 40S рибосомной субъединицей — так называемый *43S инициаторный комплекс* (см. далее). Показано, что на эукариотических мРНК, лишенных стабильной вторичной структуры в своих 5'-НТО, скорость инициации выше, чем на мРНК, содержащих такие структуры, и ингибирование инициации стабильными спиральными элементами тем сильнее, чем ближе эти элементы расположены к 5'-концу (к кэп-структуре).

Инициаторные кодоны эукариотических мРНК, в отличие от прокариотических, обычно расположены на некотором — иногда значительном — расстоянии от первичного участка связывания рибосомной частицы. Для того чтобы достигнуть инициаторного кодона, рибосомный инициаторный комплекс должен продвигаться по 5'-НТО в направлении к 3'-концу. Согласно классической модели Козак (1978, 1980, 1989), 43S инициаторный комплекс перемещается от кэп-структуры вдоль 5'-НТО по направлению к 3'-концу, последовательно расплетая вторичную структуру с сопряженным гидролизом АТФ, и в процессе своего движения «сканирует» нуклеотидную последовательность до тех пор, пока не «найдет» триплет AUG; этот триплет и становится инициаторным кодоном (рис. 14.9). Действительно, во многих эукариотических мРНК именно первый от 5'-конца триплет AUG используется в качестве инициаторного кодона и, таким образом, устанавливает рамку считывания всей последующей кодирующей последовательности.

В то же время известно множество случаев, когда первый триплет AUG не является инициаторным кодоном; тогда инициация происходит на втором или третьем (или следующем) AUG, не обязательно находящемся в одной рамке считывания с предыдущими. Действительно, сканирующая рибосомная частица (43S инициаторный комплекс) может пропускать некоторые триплеты AUG, если они находятся не в должном структурном окружении. Практически всем функциональным инициаторным кодоном AUG эукариотических мРНК предшествует триплет, начинающийся с пуринового нуклеотида, в большинстве случаев с А (см. рис. 14.9). Предполагается, что когда иницирующая 40S частица сканирует матрицу, она преимущественно узнает последовательность PuNNAUG (где N —

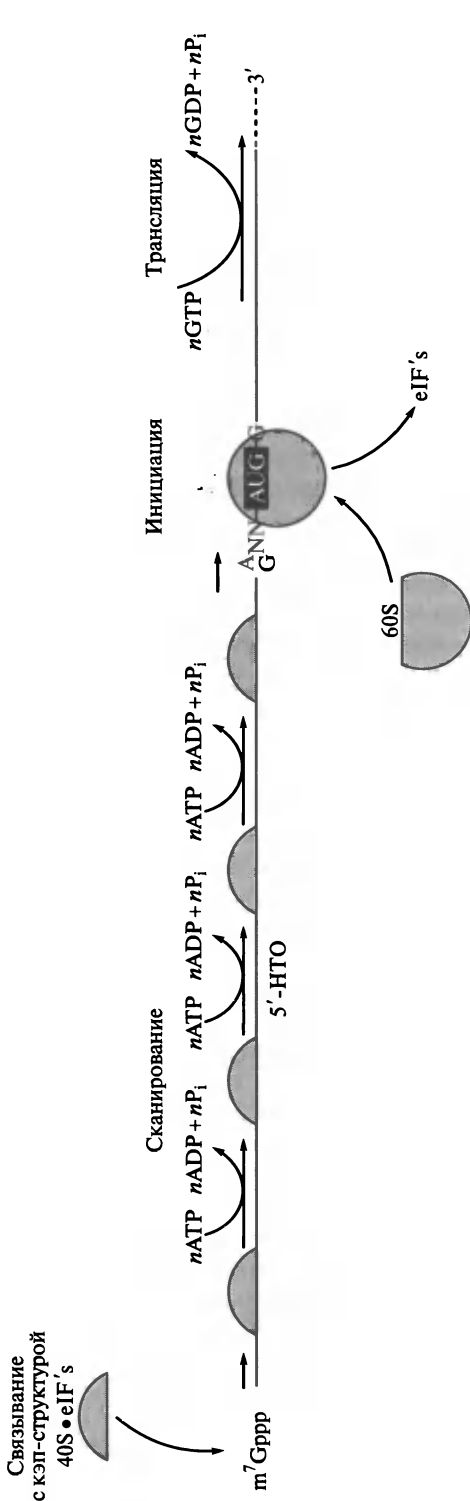


Рис. 14.9. Схема сканирования 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) эукариотической мРНК преинициаторным комплексом 40S рибосомной субъединицы с факторами инициации.

Рибосомный 43S комплекс движется по полирибонуклеотидной цепи вне рамок считывания в направлении от 5'-к 3'-концу, используя энергию гидролиза АТФ, пока не встретит триплет AUG в надлежащем контексте (указан на рисунке); этот триплет и станет инициирующим кодоном трансляции.

Kozak (1978) *Cell* 15: 1109—1123; (1980) *Cell* 22: 459—467

любой нуклеотид) в качестве коррективного участка инициации. Триплеты AUG с предшествующим триплетом PuNN являются «слабыми» инициаторными кодонами и могут быть пропущены 40S субъединицей без инициации. Кроме того, функциональным инициаторным кодоном чаще всего сопутствует G с 3'-конца и C-богатый пентануклеотид с 5'-конца; например, последовательность CCACCAUGG представляет собой «сильный» инициаторный участок с триплетом AUG внутри нее.

Имеются специальные случаи, особенно среди вирус-индуцированных мРНК, где наблюдается феномен «двух точек инициации»: первый триплет AUG распознается как инициаторный кодон лишь частью сканирующих рибосом, являясь, таким образом, всего лишь «слабым» инициатором, в то время как остальные рибосомы пропускают этот триплет без инициации и иницируют трансляцию на следующем, «сильном» AUG в другой рамке считывания. В этих случаях мРНК ведет себя как функционально бицистронная, так как синтез двух различных полипептидов иницируется и происходит на перекрывающихся нуклеотидных последовательностях. Следует также указать на случаи альтернативной инициации в одной рамке считывания, когда синтезируются функционально идентичные (или близкие по функциям) изоформы одного и того же белка с несколько разной длиной полипептидной цепи.

Необходимо добавить, что эукариотический механизм инициации гораздо более строг по отношению к структуре инициаторного триплета в сравнении с прокариотическими системами: AUG — практически единственный триплет эукариотических мРНК, используемый как инициаторный кодон. Случаи старта с других триплетов, таких как GUG, UUG, CUG и ACG, чрезвычайно редки.

14.3.3. Внутренние участки инициации

В дополнение к кэп-зависимой 5'-концевой инициации, наиболее часто используемой у эукариот, было также обнаружено, что эукариотическим системам присущ и механизм внутренней инициации. Было показано, что эукариотические рибосомы (инициирующие 40S частицы) способны узнавать специальные трехмерные структурные элементы (структурные модули) внутри молекул мРНК, связываться с ними и начинать на них либо сканирование, либо трансляцию. Такие элементы получили название «*внутренние участки посадки рибосом*», или IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*). По-видимому, IRES-структуры свойственны в основном вирусным РНК. Наиболее подробно изученный случай внутренней инициации в эукариотических системах — трансляция РНК пикорнавирусов. Некоторые клеточные мРНК эукариот, продукты генов которых контролируют рост и дифференцировку, тоже иногда содержат длинные 5'-НТО с большим количеством триплетов AUG, не используемых для инициации трансляции, и, по всей вероятности, имеют некий механизм внутренней инициации, но структурных модулей, типичных для вирусных IRES-элементов, пока не обнаружено. Примеры наиболее изученных клеточных мРНК с внутренней инициацией — мРНК *Antennapedia* из *Drosophila*, определяющая важные моменты в процессе развития мухи, и так называемая *BiP* мРНК млекопитающих, кодирующая белок шаперонного типа, который связывается с тяжелыми цепями иммуноглобулина (также иногда называемый 78 кДа глюкозо-

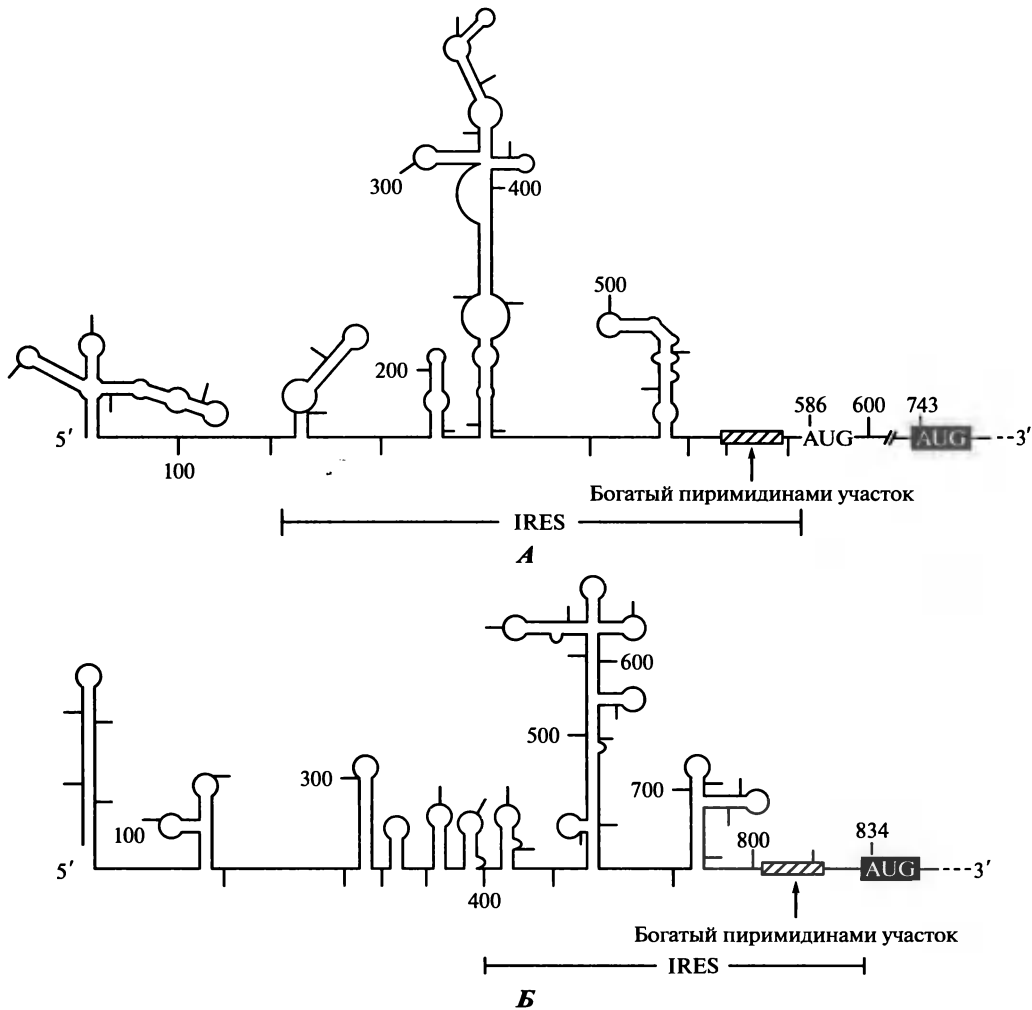


Рис. 14.10. Схемы предсказанных вторичных структур 5'-нетранслируемых областей (5'-НТО) РНК пикорнавирусов.

А: 5'-НТО РНК вируса полиомиелита. **Б:** 5'-НТО РНК вируса энцефаломиокардита.

Перерисовано с модификациями из Ehrenfeld (1996) in *Translational Control* (eds. Hershey, Mathews and Sonenberg,), pp. 549—573. CSHL Press, NY

регулируемым белком, или GRP 78) (см. Мацеяк и Сарнов, 1991; Ох, Скот и Сарнов, 1992).

Структуры IRES у разных вирусных РНК весьма разнообразны. IRES РНК различных пикорнавирусов имеют много общего между собой и в настоящее время изучены лучше всего. Типичный пикорнавирусный IRES представляет собой последовательность длиной около 450 нуклеотидных остатков. Этот участок РНК формирует вторичную и компактную трехмерную структуру, имеющую сходство непосредственно к иницилирующей 40S рибосомной частице. На рис. 14.10. схематически представлена вторичная структура IRES двух пикорнавирусов — вируса полиомиелита и вируса энцефаломиокардита. Хорошо развитая вторичная структура такого IRES участвует в формировании специфической компактной

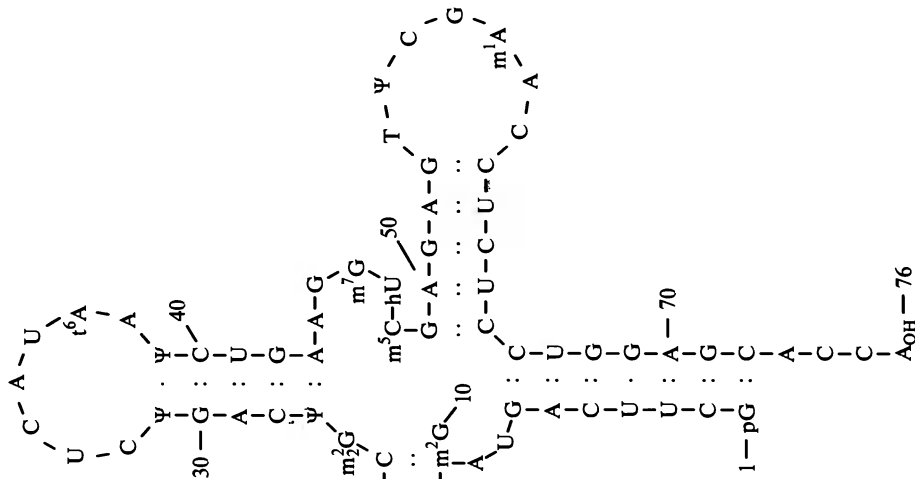
третичной структуры, способной непосредственно связываться и удерживать иницирующую 40S субъединицу. На своем 3'-проксимальном участке IRES РНК пикорнавирусов несут консервативный олигопиримидиновый тракт (у некоторых из них здесь можно видеть последовательность UUUCC, комплементарную 3'-концевой полипуриновой последовательности GGAAC 18S рРНК 40S рибосомной субъединицы). За полипиримидиновым трактом следует также неструктурированный район — так называемое *стартовое окно*, в котором на фиксированном расстоянии 20—25 нуклеотидов от олигопиримидинового тракта расположен триплет AUG. Этот триплет и узнается иницирующей рибосомной частицей, связанной с IRES. Однако AUG в составе IRES не всегда выступает в роли инициаторного кодона. Так, в случае РНК полиовируса и риновирусов рибосомные частицы с этого AUG начинают сканировать дальнейшую последовательность мРНК, иницируя трансляцию лишь на втором AUG. В то же время у кардиовирусов, включая вирус энцефаломиокардита, IRES-узнающие рибосомные частицы иницируют трансляцию именно на этом AUG стартового окна IRES (см. рис. 14.10).

Другие вирусные РНК могут иметь IRES совершенно разных типов, размеров и структур. РНК вируса гепатита С (HCV) содержит IRES длиной около 350 нуклеотидов, расположенный непосредственно перед инициаторным кодоном; он не имеет ничего общего с пикорнавирусными IRES. Еще короче — около 200 нуклеотидов — IRES пикорнаподобных вирусов насекомых, таких как вирус паралича сверчка. Между всеми этими IRES нет очевидного сходства ни в первичной, ни во вторичной структуре. Похоже, что IRES различных вирусных РНК содержат свои собственные специфические трехмерные структуры, отличающиеся от таковых пикорнавирусных РНК и друг от друга. Не совсем ясно, вовлечены ли какие-либо комплементарные взаимодействия между 18S рРНК и последовательностью IRES в ассоциацию иницирующей 40S субъединицы и IRES различных типов. В ряде случаев IRES для обеспечения эффективной внутренней инициации могут требовать участия некоторых тканеспецифичных факторов и IRES-связывающих белков (например, IRES пикорнавирусов), хотя в других случаях структурированные IRES кажутся вполне самодостаточными в выполнении своей функции и не нуждаются в дополнительных факторах (см. подразд. 14.3.7).

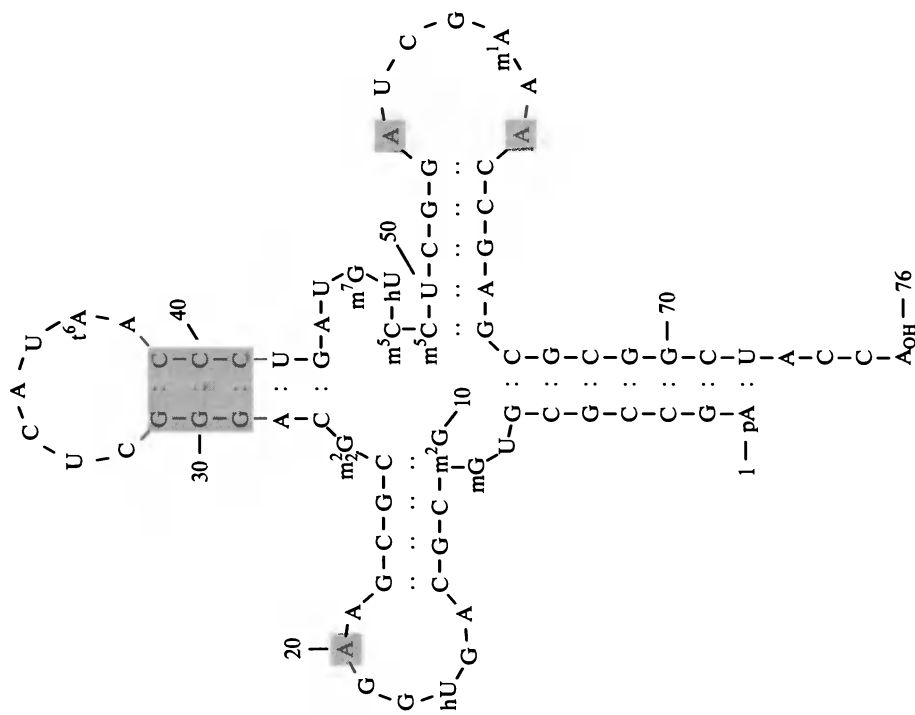
14.3.4. Эукариотическая инициаторная тРНК

В качестве инициаторной тРНК, узнающей инициаторный кодон AUG в эукариотических мРНК, выступает специальная тРНК, которая ацилируется метионил-тРНК-синтетазой. Ситуация у эукариот в этом отношении похожа на таковую у прокариот. Однако в эукариотических клетках образующаяся метионил-тРНК, в отличие от прокариотической инициаторной тРНК, не формируется. Следовательно, единственным отличием инициаторной метионил-тРНК_i^{Met} от элонгаторной метионил-тРНК_m^{Met} у эукариот являются некоторые особенности структуры самой тРНК_i, которые делают ее способной взаимодействовать с фактором инициации (eIF2) и вакантной («нативной») 40S рибосомной субъединицей и не способной связываться с фактором элонгации (eEF1A) и занимать А-участок в процессе элонгации.

Первичные и вторичные структуры (в форме клеверного листа) этих двух эукариотических тРНК представлены на рис. 14.11. Можно видеть, что различия не-



Дрожжевая tRNA^{Met}



Дрожжевая tRNA^{Met}

Рис. 14.11. Нуклеотидная последовательность и схема вторичной структуры эукариотической инициаторной метиониновой тРНК в сравнении с эукариотической элонгаторной метиониновой тРНК.

В инициаторной тРНК отмечены (серым фоном) ее характерные особенности — так называемый «тройной А» (положения 20, 54 и 60, собранные вместе в третичной структуре) и три последовательные пары G:C в спирали антикодоновой шпильки. Следует также отметить уникальный 2'-фосфорибозиладенозин в спирали ТΨ-шпильки (положение 64).

Simsek and RajBhandary (1872) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49: 508—515. Gruhl and Feldman (1975) *FEBS Letters* 57: 145—148

←

велики. Наиболее заметная черта цитоплазматических инициаторных тРНК эукариот — наличие так называемого «тройного А»: один А расположен в D-петле в положении 20 (у элонгаторных тРНК в данной позиции он встречается крайне редко), а два других — в ТΨ-петле в положениях 54 (вместо обычно расположенного там Т в элонгаторных тРНК) и 60 (вместо пиримидинового остатка в элонгаторных тРНК). Эти три А в третичной структуре расположены рядом, формируя систему водородных связей, не наблюдаемую в элонгаторных тРНК, что приводит к усилению взаимодействия между D- и ТΨ-петлями. Скорее всего, более сильные контакты в районе угла тРНК предотвращают некоторые структурные перестройки, необходимые для связывания тРНК в А-участке рибосомы в процессе элонгации.

Так же как и в случае прокариотических инициаторных тРНК, на конце антикодонового стебля присутствуют три последовательно расположенные пары G:C. Эта структурная особенность обуславливает искажение типичной конформации антикодонового стебля и петли и таким образом, возможно, обеспечивает преимущественное взаимодействие инициаторной тРНК с P-участком, но не с A-участком рибосомы.

Цитоплазматические инициаторные тРНК растений и грибов содержат гипермодифицированный пуриновый нуклеозидный остаток в положении 64. В случае дрожжевой тРНК это 2'-фосфорибозиладенозин. Было показано, что этот крупный гидрофильный остаток в положении 64 предотвращает взаимодействие Met-тРНК_i с фактором элонгации eEF1A, но не мешает связыванию с фактором инициации eIF2. Таким образом, гипермодификация в ТΨ-стебле функционирует как негативный дискриминатор eEF1A, аналогично формированию α-аминогруппы Met-тРНК_i в случае прокариот. Пока не ясно, какая особенность структуры инициаторных тРНК клеток животных (в которых нуклеотид в положении 64 не модифицирован) отвечает за негативную дискриминацию eEF1A.

В отличие от прокариотических и митохондриальных инициаторных тРНК 5'-концевой нуклеозидный остаток эукариотической цитоплазматической инициаторной тРНК спарен с нуклеозидным остатком 3'-концевой части, так же как и во всех элонгаторных тРНК. Однако в инициаторных тРНК животных, растений и грибов это всегда «слабая» пара A1:U72. Такая пара на конце спирали может быть легко разрушена, как в случае комплексов аминоацил-тРНК с аминоацил-тРНК-синтетазами класса I (см. подразд. 3.3). Привлекательным выглядит предположение, что она действительно разрушается при взаимодействии с eIF2, и тогда 3'-«хвост» загибается на себя, концевой остаток аденозилметионина ложится на спираль акцепторного стебля и метиониновый остаток может непосредственно участвовать в узнавании Met-тРНК_i белком eIF2.

14.3.5. Рибосомные факторы инициации

Эукариотические факторы инициации могут быть условно разделены на три основные группы: 1) белковые факторы, связывающиеся и оперирующие с малыми рибосомными частицами (40S субъединицами) и обеспечивающие эффективное правильное связывание Met-тРНК_i и мРНК; 2) белки, взаимодействующие в основном с мРНК и участвующие в подготовке ее 5'-нетранслируемой области к инициации; 3) белки, участвующие в ассоциации иницирующих рибосомных субъединиц и, таким образом, в формировании иницирующих 80S рибосом (см. табл. 14.1). Особняком стоит фактор инициации eIF2B, который не связывается ни с рибосомными частицами, ни с мРНК, но необходим для эффективного функционирования фактора eIF2 и регуляции его активности. В состав первой группы (называемой здесь *рибосомными факторами инициации*) входят факторы, функционально более или менее аналогичные прокариотическим IF1, IF2 и IF3 и соответственно обозначаемые eIF1, eIF1A, eIF2 и eIF3. Интересно, что среди эукариотических аналогов прокариотических факторов только eIF1A имеет структурную гомологию с IF1, а остальные — eIF1, eIF2 и eIF3 — не гомологичны IF1, IF2 и IF3 и представляют собой физически совершенно другие белки (см. табл. 14.1).

Факторы второй группы, которые рассмотрены в подразд. 14.3.6, не имеют аналогов среди бактериальных факторов инициации. В состав этой группы входят белки, узнающие кэп-структуру на 5'-мРНК и связывающиеся с ней, а также белки, связывающие и расплетающие мРНК и ответственные за АТФ-зависимое сканирование 5'-нетранслируемой области мРНК инициаторным рибосомным комплексом. Это белки группы eIF4, обозначаемые eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F и eIF4G. Белку eIF4G принадлежит важная функция объединения eIF4A и eIF4E в комплекс eIF4F, а также прямого взаимодействия с другими белками, важными для инициации, в частности с eIF3 и РАВР (рис. 14.12; см. подразд. 14.3.6).

Несколько особняком стоят факторы третьей группы — eIF5 и eIF5B, не имеющие бактериальных функциональных аналогов и способствующие ГТФ-зависимой ассоциации рибосомных субъединиц на конечной стадии процесса инициации у эукариот. Интересно, что фактор eIF5B обладает высокой структурной гомологией с бактериальным фактором IF2 (см. табл. 14.1).

В подразделах, посвященных факторам инициации, рассмотрены в основном соответствующие белки клеток млекопитающих, как наиболее изученные. Структурные и функциональные характеристики факторов инициации других эукариотических организмов, таких как высшие растения (пшеница) или грибы (дрожжи), как правило, очень близки, хотя в деталях могут несколько отличаться. Следует отметить, что факторы инициации архей (архебактерий) принципиально

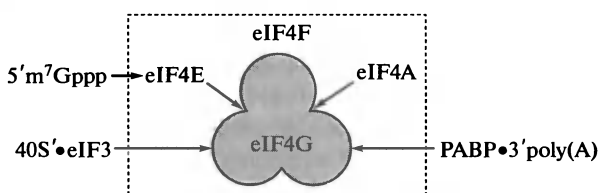


Рис. 14.12. Схема взаимодействий эукариотического фактора инициации eIF4F и его «каркасной» субъединицы eIF4G с другими белками, участвующими в инициации трансляции, и с кэп-структурой мРНК

отличаются от факторов инициации эубактерий и скорее напоминают эукариотические факторы инициации. Далее (в настоящем и следующем подразделах) рассмотрены лишь основные факторы инициации эукариот, играющие важную роль в процессе и функционально более или менее охарактеризованные. Кроме перечисленных, в научной литературе упоминается еще ряд дополнительных факторов инициации, функции которых не очень ясны и которые, по крайней мере в некоторых случаях, не столь строго необходимы для процесса инициации трансляции.

Итак, факторы eIF1 и eIF1A млекопитающих — небольшие белки с молекулярными массами 13 и 16 кДа соответственно. Участвуя в сборке 43S инициаторных комплексов, они связываются со свободной 40S субъединицей рибосомы на ее контактирующей поверхности в районе мРНК-проводящей щели («шеи») и тРНК-связывающих участков, стимулируя образование 43S инициаторных комплексов и стабилизируя их. В действии обоих факторов на сборку 43S инициаторных комплексов проявляется выраженный синергизм. Однако если eIF1A вообще стабилизирует взаимодействие тройственного комплекса Met-tRNA_i•eIF2•GTP с мРНК на иницирующей субъединице, то eIF1 модулирует его эффект, несколько дестабилизируя это взаимодействие и способствуя повышенной избирательности связывания с правильным инициаторным кодоном мРНК. По-видимому, основная функция белка eIF1A аналогична таковой прокариотического IF1 (см. подразд. 14.2.4) — это, во-первых, блокировка *A*-участка и обеспечение установки инициаторной тРНК в *P*-участке на правильном AUG кодоне и, во-вторых, совместно с eIF1, поддержание «открытого» (разомкнутого) состояния малой рибосомной субчастицы для эффективного взаимодействия с мРНК и Met-tRNA_i.

В отличие от прокариотического eIF2 его эукариотический функциональный аналог eIF2 является мультимерным и мультифункциональным белком и состоит из трех различных субъединиц: двух кислых (α , 36 кДа и β , 38 кДа) и основной (γ , 51 кДа). Как и прокариотический IF2, он взаимодействует с ГТФ и с инициаторной Met-тРНК_i. Основная функция eIF2 — ГТФ-зависимое связывание инициаторной Met-тРНК_i с иницирующей 40S рибосомной субъединицей. Также eIF2 служит мишенью регуляторного фосфорилирования специфическими фосфокиназами; фосфорилированию подвергается остаток Ser51 в α -субъединице, что приводит к ингибированию процесса формирования инициаторного комплекса и, тем самым, тотальному замедлению трансляции мРНК при активации этих киназ в клетке (см. подразд. 16.2.1.1). Таким образом, α -субъединице может быть приписана регуляторная роль в процессах инициации трансляции у эукариот. Еще одна функция, отмечавшаяся для eIF2, — это участие в связывании мРНК на иницирующей 40S субъединице, и β -субъединица действительно содержит мРНК-связывающий домен. Самая крупная — γ -субъединица — имеет высокую степень гомологии с белком EF1A — эукариотическим фактором элонгации, особенно с его G-доменом, и несет основную ответственность за связывание как ГТФ, так и Met-тРНК_i; другими словами, именно γ -субъединица, скорее всего, может быть аналогом и частичным гомологом прокариотического IF2.

Фактором, важным для инициации, но прямо не связанным с иницирующей субъединицей, является eIF2B — большой гетеромультимерный белок, поддерживающий функционирование eIF2 и состоящий из пяти различных субъединиц с молекулярными массами 34 кДа (α), 39 кДа (β), 50 кДа (γ), 60 кДа (δ) и 80 кДа

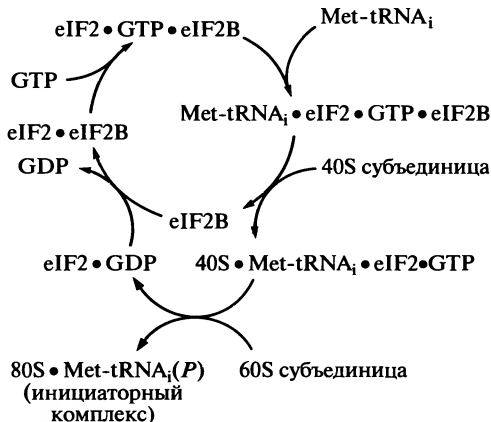


Рис. 14.13. Схема циклического использования эукариотических факторов инициации eIF2 и eIF2B.

Salimans et al. (1984) *Eur. J. Biochem.* **145**: 91–98

(ε). Он образует комплекс с eIF2 вне рибосомы и способствует обмену ГДФ на ГТФ после выхода «отработавшего» eIF2•GDP из инициаторного 48S комплекса (рис. 14.13). Функции этого сложного белка, однако, выходят далеко за пределы катализа обмена нуклеотидов на eIF2; eIF2B прежде всего представляет собой ключевое звено механизма тотального контроля скорости трансляции в эукариотических клетках, обеспечивающего регуляцию доступности активной (ГТФ-связанной) формы eIF2 для иницирующего 43S рибосомного комплекса (см. подразд. 16.2.1).

Фактор eIF3 — самый крупный и многофункциональный фактор инициации у эукариот. Его функции и даже субъединичный состав до конца не определены, но его центральная роль в обеспечении взаимодействий и сборки различных факторов на иницирующей рибосомной частице очевидна. Согласно последним определениям, в состав этого фактора входят до 13 различных субъединиц (у млекопитающих) с молекулярными массами от 16 до 170 кДа. Таким образом, eIF3 — крупная мультисубъединичная частица общей массой около 800 кДа. Она имеет сильное

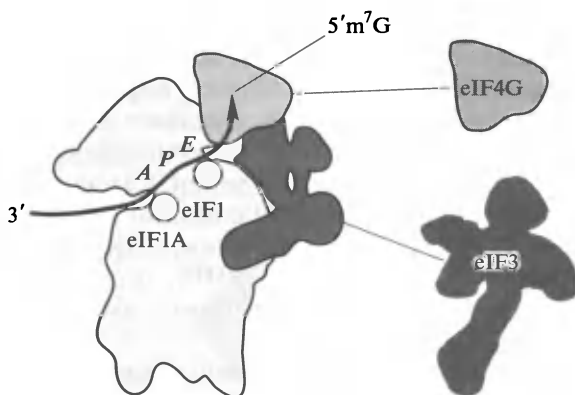


Рис. 14.14. Схема расположения эукариотических факторов инициации на контактирующей стороне 40S рибосомной субъединицы

средство к 40S рибосомной субъединице, принимая участие в диссоциации терминирующих рибосом на субъединицы и вместе с eIF1 и eIF1A формирует «нативные» 43S частицы (комплексы с 40S рибосомными субъединицами), способные затем эффективно связывать тройственный комплекс Met-tRNA_i•eIF2•GTP и мРНК. В составе иницирующего 43S комплекса этот фактор располагается на боковой лопасти («платформе») малой рибосомной субъединицы, захватывая как его внешнюю, так и внутреннюю (обращенную к большой субъединице в полной 80S рибосоме) стороны (рис. 14.14). Показано его прямое взаимодействие с мРНК и с фактором eIF4F через основную структурную субъединицу последнего — eIF4G (см. рис. 14.12 и 14.14).

14.3.6. мРНК-связывающие факторы инициации

Фактически мРНК-связывающие факторы инициации группы eIF4 могут образовывать комплекс, функционирующий как единое целое. Действительно, eIF4E является важнейшей субъединицей eIF4F, она обеспечивает узнавание кэп-структуры на 5'-конце эукариотической мРНК и связывание с ней. Другая субъединица eIF4F, обладающая АТФ-зависимой РНК-хеликазной активностью, — eIF4A; она существует также в виде свободного белка. РНК-связывающая субъединица — eIF4B — не считается частью eIF4F, но функционирует совместно с ним или с eIF4A. Самая большая субъединица комплекса eIF4F — это eIF4G, своими прямыми взаимодействиями объединяющая все субъединицы комплекса, а также обеспечивающая связывание eIF4F с eIF3 на 43S инициаторном комплексе. Следует отметить, что именно многодоменная структура eIF4G обеспечивает такое многообразие ее связывающих функций: ее N-проксимальный домен взаимодействует с РАВР, участок полипептидной цепи на расстоянии примерно одной трети ее длины от N-конца формирует eIF4E-связывающий домен, центральный и С-проксимальный домены ответственны за взаимодействия с eIF4A, а участок цепи на расстоянии около трети ее длины от С-конца представляет собой eIF3-связывающий домен.

В целом рассматривают три основные функции комплекса eIF4F в инициации трансляции: 1) узнавание кэп-структуры на 5'-конце мРНК и сопряженное с ним расплетание вторичной структуры участка, непосредственно примыкающего к кэпу; 2) последовательное расплетание вторичной структуры 5'-НТО, расположенной за кэп-структурой по направлению к 3'-концу мРНК, сопровождающееся сканированием нуклеотидной последовательности; 3) содействие корректной посадке иницирующей 40S рибосомной субъединицы (43S инициаторного комплекса) на район инициаторного кодона мРНК с образованием 48S инициаторного комплекса. Соответственно имеются в виду три различные активности комплекса eIF4F: АТФ-независимая кэп-связывающая активность, АТФ-зависимая РНК-хеликазная активность, а также специфическое сродство к 43S инициаторному комплексу — главным образом через связывание eIF4G с eIF3, сидящим на «нативной» 40S субъединице.

14.3.6.1. Кэп-связывающий комплекс

Фактор инициации eIF4F специфически связывается с кэп-структурами эукариотических мРНК. Обычно в качестве компонентов этого кэп-связывающего

фактора у млекопитающих рассматриваются три субъединицы: α (p25, или eIF4E), отвечающая за узнавание кэп-структуры; β (p45), являющаяся РНК-зависимой АТФазой и идентичная свободному белку eIF4A; γ (p220, или eIF4G; действительная молекулярная масса около 180 кДа), представляющая собой объединяющий — «базовый» — белок комплекса eIF4F. Однако β -субъединица (eIF4A) сравнительно слабо связана с комплексом и может частично теряться в процессе выделения и очистки eIF4F; eIF4A вообще не обнаруживается в составе комплекса eIF4F, выделенного из некоторых объектов, например из зародышей пшеницы. В любом случае eIF4A может быть исключен из состава eIF4F без потери кэп-связывающей активности; таким образом, ассоциат eIF4G с eIF4E может считаться минимальным кэп-связывающим комплексом. На самом деле изолированный белок eIF4E также обладает способностью связываться с кэп-структурой, но в отсутствие eIF4G это связывание нестабильно и легко обратимо, а в комплексе с eIF4G прочно и характеризуется большим временем жизни.

Интересно, что в зародышах пшеницы были обнаружены два различных кэп-связывающих комплекса. Один из них похож на комплекс eIF4F млекопитающих и содержит субъединицы p26 (eIF4E) и p220 (eIF4G), в то время как другой состоит из иммунологически неродственных субъединиц p28 и p80. «Типичный» eIF4F в зародышах пшеницы представлен в значительно меньшем количестве, чем «изо»-eIF4F.

Итак, в целом eIF4F — это РНК-связывающий белок в том смысле, что он, хотя и имеет неспецифическое сродство к любой РНК, но сильно и специфически связывается с кэп-структурами эукариотических мРНК благодаря присутствию субъединицы p25 (eIF4E), узнающей кэп-структуру. Связывание с кэп-структурой независимо от АТФ. Сразу после связывания с кэп-структурой или уже во время связывания происходит расплетание участка мРНК, непосредственно примыкающего к кэп-структуре. Неизвестно, однако, является ли это первичное расплетание тоже АТФ-независимым процессом, осуществляясь только за счет взаимодействия eIF4G-субъединицы с вышеуказанным участком тРНК, или в него уже вовлекается АТФ-зависимая хеликаза eIF4A.

Белок eIF4E — наиболее дефицитный среди всех эукариотических факторов инициации и их субъединиц, так что кэп-связывающий комплекс как единое целое (eIF4F) присутствует в клетках в ограниченных количествах. В такой ситуации цитоплазматические мРНК должны конкурировать между собой за связывание с eIF4F (см. подразд. 16.3.2 и 16.3.3).

14.3.6.2. РНК-хеликазный комплекс

Последовательное расплетание пространственной структуры 5'-НТО, необходимое для сканирования первичной структуры инициаторным 43S комплексом, осуществляется благодаря участию АТФ-зависимой хеликазы eIF4A. Существуют два функциональных хеликазных комплекса: комбинация eIF4F($\alpha\beta\gamma$) и eIF4B, и комбинация свободного eIF4A и eIF4B. В обоих случаях в процессе непосредственно участвуют (и необходимы для него) два белка — eIF4A и eIF4B. Фактор eIF4A — двухдоменный белок молекулярной массой 46 кДа, представленный в эукариотических клетках в значительном избытке по отношению ко всем другим факторам инициации. И в свободной форме, и в составе комплекса eIF4F, будучи связанным с субъединицей eIF4G, он в присутствии АТФ способен связывать-

ся с одноцепочечными участками РНК и проявляя РНК-зависимую АТФазную активность; фактор eIF4B как-то стимулирует оба этих эффекта. Гидролиз АТФ приводит к потере РНК-связывающей способности, и белок диссоциирует от РНК. Непрерывное повторение циклов, состоящих из АТФ-зависимого связывания с одноцепочечными участками РНК, последующего РНК-индуцированного расщепления АТФ и проистекающего отсюда освобождения eIF4A (рис. 14.15), сдвигает равновесие между структурированным и развернутым состоянием данного участка в сторону развернутого состояния, что должно облегчать движение рибосомной частицы вдоль цепи мРНК. Очевидно, однако, что этот эффект eIF4A на структуру 5'-НТО не может обеспечить требуемой полярности (однаправленности) движения рибосомной частицы.

Аминокислотная последовательность белка eIF4A указывает на его принадлежность к так называемому семейству белков DEAD; эти белки представлены в различных компартментах эукариотической клетки и вовлечены в множество клеточных процессов. Считается, что все они проявляют как АТФазную, так и РНК-расплетательную активность. Существуют несколько консервативных аминокислотных последовательностей, включая два мотива (AlaXXXXGlyLysThr, где X — любая аминокислота, и AspGluAlaAsp, или DEAD), весьма характерных для АТФаз. Таким образом, можно заключить, что eIF4A является каталитической АТФазной и расплетательной субъединицей хеликазного инициаторного комплекса.

Фактор eIF4B — белок молекулярной массой около 70 кДа, количественно значительно менее представленный в клетках по сравнению с eIF4A. Если он и способен прямо связываться с eIF4F, то сравнительно слабо, и скорее его взаимодействия с eIF4F (и его субъединицей eIF4A) поддерживаются в результате связывания с рибосомной РНК и фактором eIF3 на «нативной» 40S субъединице, с которой связывается и eIF4F. В своей третичной структуре eIF4B содержит типичный РНК-связывающий домен, или RRM («*RNA Recognition Motif*»), с двумя повторяющимися консервативными мотивами аминокислотных последовательностей (так называемыми мотивами *RNP-1* и *RNP-2*), характерными также для поли(А)-связывающего белка (см. подразд. 2.6), ряда белков ядерных РНП (hnRNP), белков La и Ro, и многих других РНК-связывающих белков эукариотических клеток. Этот неспецифический РНК-связывающий домен, а также аргинин-богатый домен белка могут играть важную роль во взаимодействиях с мРНК и рибосомной РНК. В целом, однако, механизм участия eIF4B в расплетании структуры мРНК, стимуляции действия eIF4A и сканировании 5'-НТО инициаторным 43S рибосомным комплексом с участием eIF4A не изучен.

Для понимания механизма последовательного однонаправленного движения рибосомной частицы вдоль 5'-НТО от кэп-структуры к инициаторному кодону

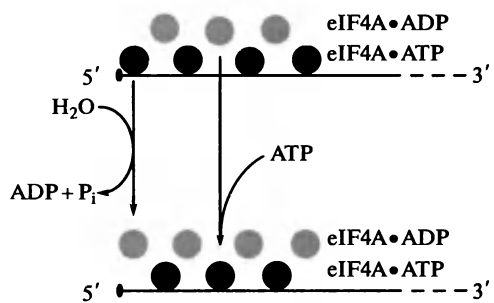


Рис. 14.15. Модель динамического поддержания расплетенного состояния РНК (5'-НТО мРНК) за счет АТФ-индуцированного сродства фактора eIF4A к развернутому состоянию полирибонуклеотидной цепи.

Черными кружками обозначены комплексы eIF4A•АТФ, имеющие сродство к развернутой РНК, серыми — молекулы eIF4A, диссоциировавшие от РНК в результате гидролиза АТФ

Наиболее важен тот факт, что геликазный комплекс eIF4G • eIF4A с участием eIF4B локализуется на выходе из мРНК-связывающей щели 40S субъединицы, у *E*-участка (см. рис. 14.14), т.е. сзади сканирующей частицы, движущейся в направлении от 5'- к 3'-концу мРНК. Это значит, что eIF4F-связанная геликаза работает на участке, только что пройденном рибосомной частицей, а не перед ней. Именно так и должно быть, если исходить из принципов работы молекулярной машины, использующей беспорядочное тепловое движение как «движущую силу» и молекулярный храповик («демон Максвелла») для фиксации положений в процессе однонаправленного перемещения частицы (см. гл. 18). Предположительная последовательность событий при движении инициаторного 43S рибосомного комплекса от кэп-структуры к инициаторному кодону может быть представлена следующим образом.

1. Субъединица eIF4E кэп-связывающего комплекса eIF4F связывается с кэп-структурой мРНК, а субъединица eIF4G кэп-связывающего комплекса eIF4F связывается с eIF3, сидящим на «нативной» 40S рибосомной субъединице (см. рис. 14.12) у выхода из мРНК-проводящей щели (вблизи *E*-участка рибосомы) (см. рис. 14.14). Участок мРНК, непосредственно примыкающий к кэп-структуре, размещается в мРНК-связывающей щели.

2. Тепловые флуктуации (локальное расплетание) пространственной структуры мРНК непосредственно перед входом в мРНК-проводящую щель 40S рибосомной частицы, т.е. по 3'-сторону от последней, создают возможность ее диффузионного перемещения по направлению к 3'-концу, а немедленное АТФ-прототируемое связывание субъединицы eIF4A рибосомосвязанного фактора eIF4F по другую — 5'-сторону — рибосомной частицы блокирует ее обратное перемещение (молекулярный храповик).

3. Гидролиз связанного АТФ, индуцируемый РНК и дополнительно промотируемый взаимодействием с белком eIF4B, приводит к конформационному изменению (размыканию доменов) субъединицы eIF4A и потере ее сродства к цепи мРНК и к мРНК-связанному белку eIF4B.

4. В результате исчезновения связи с участком мРНК по 5'-сторону от рибосомной частицы весь инициаторный 43S комплекс снова оказывается освобожденным для диффузионного скольжения вдоль цепи мРНК. Однако присутствие белка eIF4B на мРНК позади рибосомной субъединицы препятствует ее сдвигу назад (к 5'-концу) и оставляет разрешенным только сдвиг вперед (к 3'-концу).

5. Связывание АТФ с субъединицей eIF4A (замещение АДФ на АТФ) вновь приводит к смыканию доменов субъединицы eIF4A, восстановлению сродства к РНК и, следовательно, фиксации всего рибосомного комплекса на новом, продвинутом к 3'-концу, месте ее цепи.

6. Белок eIF4B, находящийся в равновесии между РНК-связанным и свободным состоянием, переходит в более прочно связанное состояние на мРНК, комплексируясь с РНК-связанной eIF4A в сомкнутой (АТФ-индуцированной) конформации.

Таким образом, рабочий цикл молекулярной машины, включающий три последовательных конформационных состояния, замкнулся, произведя один шаг поступательного движения вдоль цепи мРНК по направлению от 5'-конца к 3'-концу. В целом цикл может рассматриваться как фейнмановский молекулярный храповик, где роль «собачки» играет белок eIF4B (с субъединицей eIF4A и без), а пружинки, возвращающей «собачку» в запирающее положение, — молекулы АТФ (через субъединицу eIF4A) (см. гл. 18). Сканирующий инициаторный

рибосомный 43S комплекс, связанный с компонентами eIF4F, можно представить как молекулярную РНК-связывающую и РНК-расплетающую машину, сидящую на мРНК и движущуюся по ней благодаря тепловым флуктуациям и одномерной диффузии при блокировке обратных шагов за счет свободной энергии гидролиза АТФ. Кроме того, присутствие в цитозоле дополнительных РНК-хеликаз может помогать 43S комплексу проходить сильно структурированные участки 5'-НТО, осуществляя АТФ-зависимое расплетание спиралей впереди сканирующей частицы.

14.3.7. Факторы инициации, участвующие в формировании 80S рибосом

Белок eIF5 — это фактор инициации, не имеющий аналога у прокариот. Он представляет собой мономер молекулярной массой около 50 кДа. Фактор индуцирует ГТФазную активность на eIF2, связанном с иницирующей 40S частицей (в составе 48S комплекса), и освобождение eIF2 с ГДФ из 40S субъединицы перед присоединением к ней 60S рибосомной субъединицы. (У прокариот эти функции, как описано в подразд. 14.2.5, выполняются непосредственно большой рибосомной субъединицей — ее факторсвязывающим центром.)

Еще один белок, принимающий участие в присоединении 60S рибосомной субъединицы и формировании 80S рибосомы, — eIF5B. Это — крупный мономер молекулярной массой около 140 кДа, имеющий сильную гомологию с бактериальным IF2. Оказалось, что у эукариот для ассоциации рибосомных субъединиц на завершающей стадии инициации трансляции недостаточно ухода eIF2 с контактирующей поверхности малой субъединицы. После гидролиза ГТФ и ухода eIF2•GDP на 40S субъединицу приходит eIF5B с ГТФ, который взаимодействует также и с большой (60S) рибосомной субъединицей; последняя (ее факторсвязывающий центр) индуцирует ГТФазную активность eIF5B, ГТФ гидролизуется, eIF5B и ГДФ уходят и две субъединицы ассоциируют должным образом, образуя 80S рибосомный комплекс, готовый к восприятию первой элонгаторной аминоксил-тРНК.

14.3.8. Дополнительные IRES-связывающие факторы и факторнезависимые IRES

14.3.8.1. ITAF

В ряде случаев для кэп-независимой инициации на внутренних участках посдак рибосом (IRES), в дополнение к набору обычных факторов инициации (eIF2, eIF3, eIF4F), необходимы специальные IRES-связывающие белки, обозначаемые ITAF (IRES Trans-Acting Factors). По крайней мере четыре клеточных белка, рассмотренных ниже, могут быть отнесены к таким факторам, вовлеченным в IRES-зависимую трансляцию различных пикорнавирусных РНК.

Так называемый PTB (Pyrimidine Tract-Binding protein, или p57) — это РНК-связывающий белок, имеющий специфическое средство к IRES всех пикорнавирусных РНК. Было обнаружено, что этот белок либо является обязательным для инициации трансляции пикорнавирусных РНК, либо стимулирует ее. Скорее

всего, белок связывается со структурированными участками пикорнавирусных IRES, тем самым стабилизируя специфическую активную конформацию IRES. РТВ оказался идентичен ядерному белку, который был известен ранее, и получил это название, так как предпочтительно связывается с полипиримидиновыми трактами вблизи 3'-концов интронов пре-мРНК. Этот белок принадлежит к семейству РНК-связывающих белков с четырьмя РНК-связывающими доменами (RBD), но не содержит последовательностей типичных мотивов *RNP-1* и *RNP-2*. Хотя он был впервые обнаружен в нуклеоплазме интерфазных клеток, было показано, что он может присутствовать также в цитоплазме и в ее рибосомной фракции. Данных об участии РТВ во внутренней инициации клеточных мРНК на сегодняшний день не существует.

«*La*-антиген» (или р52) — это белок, способный специфически связываться с 3'-концевым доменом полиовирусного IRES и стимулирующий инициацию трансляции полиовирусной РНК, а также увеличивающий точность выбора правильного иницирующего кодона на ней. Было обнаружено, что белок идентичен человеческому *La*-антигену, выявленному ранее с помощью антител в клетках некоторых пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как эритематозная волчанка. Будучи РНК-связывающим белком, он содержит типичный РНК-узнающий мотив типа *RNP-1*. Так же как в предыдущем случае, было показано, что в нормальных клетках млекопитающих белок *La* локализован в основном в ядре, где он может быть вовлечен в созревание транскриптов РНК-полимеразы III, но некоторое количество этого белка присутствует в цитоплазме.

Другой ITAF, тоже специфически взаимодействующий с IRES полиовирусной РНК, — это так называемый PCBP-2 («Poly(rC) Binding Protein-2»). Как и РТВ, он также содержит несколько РНК-связывающих доменов и, по-видимому, стабилизирует активную структуру IRES благодаря многоточечным контактам с ним.

Интересен белок, обозначаемый ITAF45 (45 кДа). Он, наряду с РТВ, связывается с IRES РНК вируса ящура и стимулирует присоединение к нему eIF4F (eIF4G • eIF4A). По-видимому, основной вклад ITAF45, как и в ранее упомянутых ITAF, состоит в стабилизации или корректировке активной конформации IRES. Хотя белок может связываться с IRES РНК других пикорнавирусов, его стимулирующий эффект на инициацию трансляции специфичен для РНК вируса ящура.

14.3.8.2. eIF-независимые IRES

Наряду с IRES, для функционирования которых требуются клеточные белки — прежде всего, классические факторы инициации, а также в ряде случаев дополнительные факторы (ITAF), существуют IRES, частично или полностью независимые от клеточных факторов инициации. Классический пример — IRES РНК вируса гепатита С (HCV). Длина участка полинуклеотидной цепи, соответствующей HCV IRES, — около 350 нуклеотидных остатков. Ущеп образует две длинные и несколько коротких шпикел, свернутых в третичную структуру типа изгибающегося червяка. Эта структура способна специфически связываться с рибосомной 40S субъединицей на ее боковой лопасти, в основном на внешней стороне, но с «хвостом», заходящим на внутреннюю (контактирующую) поверхность в районе «шеи» субъединицы. Инициаторный кодон,

расположенный на 3'-конце IRES, оказывается в непосредственной близости от *P*-участка малой субъединицы. Последующее взаимодействие с тройственным комплексом Met-tRNA_i•eIF2•GTP приводит к посадке Met-тРНК_i в *P*-участок, образованию там кодон-антикодоновой пары с инициаторным кодоном AUG и, таким образом, к формированию 48S инициаторного комплекса. Никакого участия АТФ и его гидролитического расщепления здесь не требуется. Естественно, что в условиях *in vivo* на иницирующей 40S субъединице всегда присутствует eIF3, но он не мешает образованию комплекса IRES с 40S субъединицей. При этом eIF3, тоже сидящий на боковом выступе субъединицы, сам взаимодействует с IRES и, может быть, даже помогает точности посадки Met-тРНК_i на инициаторный кодон в *P*-участке. Последующая стадия инициации — присоединение 60S субъединицы и образование 80S рибосомы — происходит, по-видимому, как обычно, с участием eIF5 и eIF5B и сопровождается гидролизом ГТФ. Таким образом, в данном случае инициация не зависит от всех факторов группы eIF4.

Примером IRES, полностью независимого от клеточных факторов инициации и даже от инициаторной Met-тРНК_i, является IRES мРНК вируса паралича сверчка (*Cricket Paralysis Virus*, CrPV) и других пикорнаподобных вирусов насекомых. Как уже указывалось, эти IRES, локализованные во внутреннем межгенном районе РНК, еще короче, чем HCV, — всего около 200 нуклеотидных остатков, но тоже хорошо структурированы. Они тоже образуют комплексы с рибосомными 40S субъединицами независимо от факторов инициации. Однако, в отличие от HCV IRES, эти IRES взаимодействует с контактирующей стороной 40S субъединицы, в районе ее «шеи» у боковой лопасти («платформы»). На 3'-конце IRES расположен 40-нуклеотидный псевдоузел, имитирующий тРНК с антикодоном AGG, который, связываясь с триплетом CCU (пролиновый кодон) IRES, установленным в *P*-участке, образует с ним «кодон-антикодоновую» пару. При этом, в случае CrPV IRES, в *A*-участке устанавливается следующий — аланиновый — кодон (GCU). Так как IRES имеет также и сродство к 60S субъединице, то последняя присоединяется к IRES-связанной 40S субъединице, и образуется инициаторный 80S рибосомный комплекс с IRES между субъединицами, с *P*-участком, занятым его доменом, и с вакантным *A*-участком, в котором установлен аланиновый кодон GCU. С этого момента начинается трансляция вирусной РНК: элонгаторная-аланил-тРНК в составе обычного тройственного комплекса Ala-tRNA•eEF1•GTP связывается с *A*-участком 80S рибосомы, после чего происходит индуцированный 60S субъединицей гидролиз ГТФ, освобождение eEF1•GDP и спонтанная транслокация Ala-тРНК из *A*-участка в *P*-участок с вытеснением тРНК-подобного домена IRES из *P*-участка. Таким образом, инициация трансляции происходит вовсе не на инициаторном триплете AUG, установленном в *P*-участке, как обычно, а на аланиновом кодоне GCU в *A*-участке (см. Вильсон и др., 2000). В случаях других известных пикорнаподобных вирусов насекомых вместо аланинового кодона GCU может быть либо аланиновый кодон GCA, либо глутаминовый кодон САА. Участниками инициации, обеспечиваемой описанным выше механизмом, оказываются не инициаторная тРНК и eIF2, а элонгаторная тРНК и eEF1. Самое интересное состоит в том, что в процессе этой инициации элонгаторная аминоксил-тРНК, освободившаяся от eEF1, спонтанно, без участия фактора элонгации eEF2 и ГТФ, перемещается вместе со своим кодоном (транслоцируется) из *A*-участка в *P*-участок новообразованной 80S рибосомы, вытесняя оттуда псевдоузел IRES

и оставляя вакантным А-участок с установленным там очередным кодоном для последующей элонгации.

14.3.9. 3'-Концевые усилители инициации

Одна из самых замечательных особенностей эукариотической трансляции заключается в том, что она может быть инициирована или стимулирована (в некоторых случаях модифицирована — см., например, кодирование селеноцистеина терминирующим кодоном UGA у эукариот, подразд. 9.2.2) некоторыми элементами мРНК, находящимися весьма далеко по цепи от участка инициации, — прежде всего в 3'-нетранслируемой области.

14.3.9.1. Поли(А)-«хвост»

Наиболее изученным и универсальным 3'-концевым усилителем трансляции эукариотических мРНК является их поли(А)-«хвост». Усиливающий эффект поли(А)-«хвоста» состоит в том, что он прямо участвует в механизме инициации трансляции и увеличивает ее эффективность. Усиливающий эффект поли(А)-«хвоста» обязательно требует присутствия поли(А)-связывающего белка (РАВР) и его множественного (многокопийного) связывания с поли(А).

Оказалось, что комплекс поли(А)-«хвоста» с РАВР играет роль усилителя инициации, входя в прямой контакт с 5'-концевым районом мРНК. Было показано, что именно сам белок — РАВР — взаимодействует с eIF4G-субъединицей в составе фактора инициации eIF4F. Так как усиливающий эффект поли(А)-«хвоста» в значительной мере зависит от присутствия кэп-структуры на 5'-конце, то считается, что молекулы РАВР, сидящие на «хвосте» и взаимодействующие с eIF4G-субъединицей фактора eIF4F, привлекают к себе кэпированный 5'-конец мРНК путем его связывания с кэп-связывающей eIF4E-субъединицей фактора eIF4F, приводя к смыканию 5'-конца с поли(А)-«хвостом», т.е. к образованию так называемой «замкнутой петли» мРНК. С другой стороны, eIF4G имеет сродство к фактору eIF3 и может связываться с ним на иницирующей 40S рибосомной субъединице. Таким образом, РАВР через взаимодействие с eIF4G обеспечивает механизм привлечения как мРНК-связывающих факторов инициации (eIF4F = eIF4G + eIF4A + eIF4E), так и «нативных» 40S субъединиц к 5'-концу мРНК.

Как результат poly(A)•РАВР-стимулируемой инициации трансляции, в транслирующей полирибосоме начало и конец цепочки мРНК — ее 5'-нетранслируемая область с перманентно иницирующими 40S рибосомными субъединицами и поли(А)-«хвоста» — должны быть в постоянном динамическом взаимодействии друг с другом через образование белковых мостиков РАВР•eIF4G•eIF3•40S, что приводит к «циркуляризации» полирибосом (рис. 14.16). Действительно, электронно-микроскопические наблюдения показывают, что сформированные эукариотические полирибосомы часто имеют кольцевую организацию (см. рис. 4.4, а также Шелтон и Куфф, 1966; Йошида и др., 1997). В случае крупных — «тяжелых» — полирибосом с плотно следующими друг за другом рибосомами иногда вместо колец (или наряду с ними) видны упорядоченные «двойные ряды» рибосомных частиц на мРНК, которые могут быть интерпретированы как спавшиеся

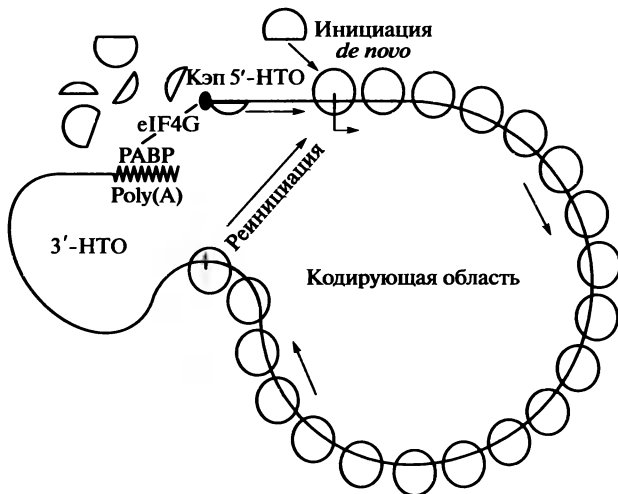


Рис. 14.16. Схематическое изображение циркуляризованной эукариотической полирибосомы, образующейся за счет взаимодействия кэп-структуры с поли(А)-«хвостом» через белковый мостик eIF4E•eIF4G•PABP.

Munroe and Jacobson (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3441–3455. Gallie and Tanguay (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 17166–17173. Tarun and Sachs (1995) *Genes Dev.* **9**: 2997–3007. Gallie (1998) *Gene* **216**: 1–11

(сложенные) кольца (см. рис. 4.5 и 4.6); возможно, такое складывание колец сопровождается также кратковременными (динамическими) взаимодействиями между рибосомными частицами антипараллельных рядов в определенной однотипной ориентации (см. рис. 4.6, **Б**).

Следует отметить, что циркуляризация эукариотических полирибосом возможна и в случае мРНК без кэп-структуры и поли(А)-«хвоста» (Копейна, Спиринов и др., 2008). Не исключено, что циркуляризация может достигаться в результате складывания транслирующих полирибосом пополам и взаимодействия антипараллельных половинок друг с другом, как показано на рис. 4.6, **Б**. По-видимому, циркуляризация полирибосом обеспечивает эффективную «круговую» трансляцию мРНК: благодаря сближенности 5'- и 3'-концов матричного полинуклеотида рибосомы, закончившие трансляцию у 3'-конца матрицы, не освобождаются в раствор, а могут переходить прямо на 5'-концевую часть мРНК, начиная новый раунд трансляции. При этом возможна реинициация без сканирования 5'-нетранслируемой области, путем непосредственного перехода рибосом с терминирующего кодона на инициаторный кодон той же мРНК.

14.3.9.2. 3'-Концевая шпилька гистоновой мРНК

Хотя подавляющее большинство эукариотических мРНК имеют поли(А)-«хвост», мРНК, кодирующие гистоны, синтез которых регулируется клеточным циклом, являются исключением — во всяком случае у млекопитающих и других Metazoa. Вместо поли(А)-«хвоста» на конце таких гистоновых мРНК расположена эволюционно консервативная шпилька с шестью каноническими парами оснований в ее двойной спирали и четырехнуклеотидной петлей на торце (рис. 14.17). Наличие этой структуры, как оказалось, тоже обеспечивает высокий уровень ини-



Рис. 14.17. Эволюционно консервативная 3'-концевая шпилька гистоновых мРНК млекопитающих, заменяющая поли(А)-«хвост».

Gallie et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**: 1954–1962. Ling et al. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7853–7867

C-A-A-A-G : C-A-C-U-U-A

циации трансляции экпированной мРНК. В клетках млекопитающих в составе активных полирибосом был обнаружен небольшой белок (Stem-Loop-Binding

Protein, или SLBP, 31 кДа), специфически связывающийся с этой шпилькой и необходимый для ее функционирования как усилителя трансляции. В механизме усиления, как и в случае poly(A)•PABP, участвуют факторы инициации eIF4G, eIF4E и eIF3, причем для eIF4G показано его прямое взаимодействие с SLBP. Таким образом, очень вероятно, что SLBP действует подобно PABP, формируя белковые мостики SLBP•eIF4G•eIF4E и SLBP•eIF4G•eIF3 между 3'-концом мРНК, с одной стороны, и ее экпированным 5'-концом и иницирующей 40S рибосомной субъединицей, с другой. Возможно, что PABP, всегда присутствующий в клетках, тоже присоединяется к eIF4G и участвует в формировании этих мостиков и усилении инициации трансляции.

14.3.9.3. Структурированные домены 3'-нетранслируемой области РНК растительных вирусов

Существует группа усилителей трансляции более специального типа — компактные домены, включающие в себя несколько (обычно три) последовательно расположенных псевдоузлов в 3'-НТО, характерная для РНК вирусов растений (в частности, тобамовирусов, тимовирусов и бромовирусов). Эти РНК экпированы, но не полиаденилированы, и псевдоузловой домен, следующий непосредственно за кодирующей частью РНК, с примыкающей к нему 3'-концевой тРНК-подобной структурой (рис. 14.18) заменяют поли(А)-«хвост». Следует отметить, что РНК некоторых растительных вирусов — например, вируса мозаики люцерны (Alfalfa Mosaic Virus, AlMV) — лишены тРНК-подобного домена на конце 3'-НТО и имеют лишь псевдоузловой домен, который выполняет ту же функцию усиления трансляции. Имеются все основания полагать, что именно псевдоузловой домен внутри 3'-НТО вирусных РНК играет основную роль в усилении трансляции предшествующих кодирующих последовательностей. Интересно, что искусственные конструкции мРНК с вирусной 3'-НТО, содержащей псевдоузловые структуры, транслируются в животных клетках или их экстрактах так же эффективно, как мРНК с поли(А)-«хвостом». При этом наблюдается функциональный синергизм между вирусной 3'-нетранслируемой областью и экп-структурой на 5'-конце мРНК. Тот факт, что усиливающий эффект 3'-НТО РНК растительных вирусов проявляется в цитоплазме и экстрактах животных клеток, наводит на мысль о существовании универсального белкового фактора, способного связываться с вышеуказанными структурными элементами «хвостов» вирусных РНК и, вероятно всего, отличного от PABP.

Более детальное изучение функциональной роли различных участков 3'-НТО РНК вируса табачной мозаики (Tobacco Mosaic Virus, TMV) показало, что их эффект на трансляцию обусловлен стимуляцией инициации трансляции, и для это-

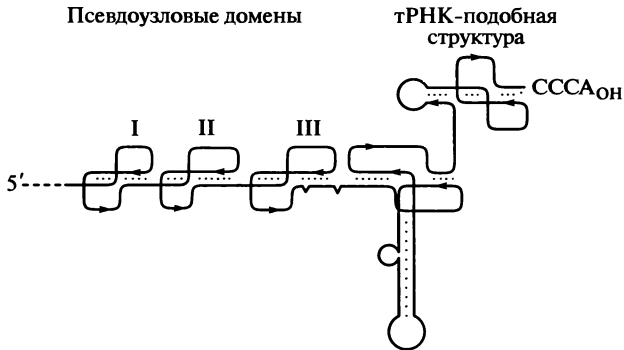


Рис. 14.18. Схема 3'-нетранслируемой области РНК вируса табачной мозаики (ВТМ), включающей домен из трех псевдоузлов и 3'-концевой домен с тРНК-подобной структурой.

Gallie and Walbot (1990) *Genes Dev.* **4**: 1149—1157. Gallie et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**: 5031—5036.
Leathers et al. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5331—5347

го важен прежде всего 72-нуклеотидный домен, расположенный непосредственно после кодирующей последовательности и состоящий из трех псевдоузлов (см. рис. 14.18). Удаление этого псевдоузлового домена приводит к практически полному исчезновению стимулирующей активности всего «хвоста». Избирательное удаление или разрушение одного псевдоузла приводит к снижению стимулирующей активности, но наиболее критичным оказывается удаление третьего, а наименее — первого псевдоузла.

У эволюционно и структурно более далеких растительных вирусов в РНК могут присутствовать усилители трансляции совсем другого типа. Так, РНК сателлитного вируса некроза табака (Satellite Tobacco Necrosis Virus, STNV) и вируса желтой карликовости ячменя (Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV) не имеют ни поли(А)-«хвоста», ни кЭп-структуры на 5'-конце, но очень эффективно транслируются благодаря высокой скорости инициации трансляции. Высокая скорость инициации обеспечивается специальными структурированными доменами (Translation Enhancing Domains, TED) внутри их 3'-нетранслируемых областей. Было показано, что эти домены функционируют синергично с короткими некЭп-пированными лидерами своих РНК; возможно, синергизм достигается за счет взаимодействия TED с лидером — либо прямого (РНК-РНК), либо через посредство каких-то белковых факторов.

14.3.9.4. Концевой тРНК-подобный домен РНК растительных вирусов

3'-Концевые тРНК-подобные домены вирусных РНК, упомянутых в подразд. 14.3.9.3, способны взаимодействовать с клеточными аминоксил-тРНК-синтетазами и аминокислотироваться с их помощью, как и настоящие тРНК. Специфичность аминокислотирования различна для разных вирусных РНК. Так, 3'-конец РНК вируса табачной мозаики (ВТМ) (рис. 14.19) специфически взаимодействует с гистидиновой аминоксил-тРНК-синтетазой и соответственно ацилируется гистидином. Подобным же образом РНК вируса желтой мозаики турнепса (Turnip Yellow Mosaic Virus, TYMV) ацилируется валином, а РНК вируса мозаики костра (Brome Mosaic Virus, BMV) — тирозином. Роль 3'-концевых тРНК-подобных до-

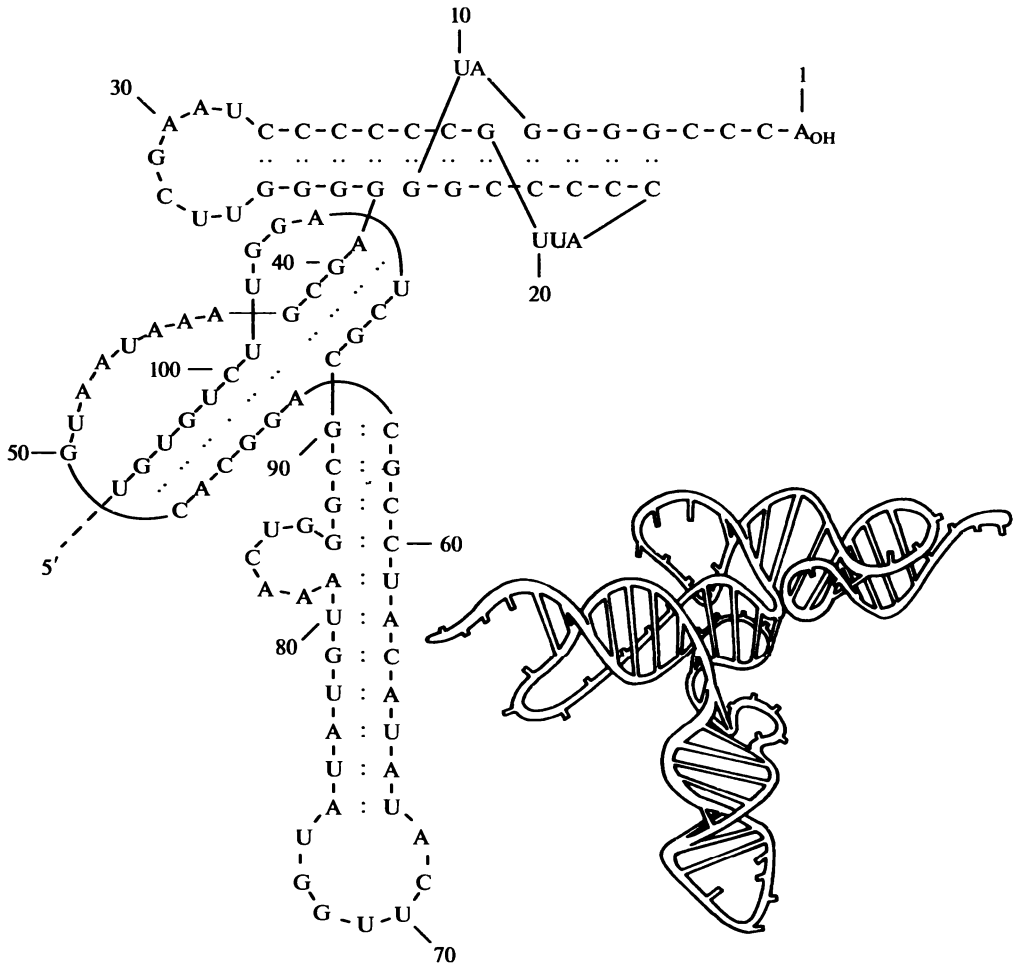


Рис. 14.19. Вторичная и третичная структуры 3'-концевого тРНК-подобного домена РНК вируса табачной мозаики.

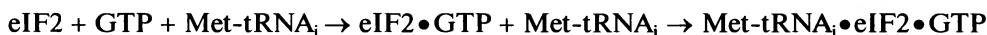
Воспроизведено с модификациями из Rietveld et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2613–2619

менов и аминокислотных остатков на 3'-концах вирусных РНК в трансляции не ясна.

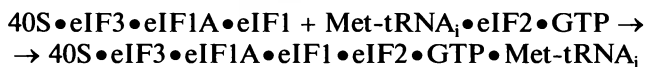
14.3.10. Последовательность событий канонической инициации трансляции

Этап 1. Для того чтобы начать процесс инициации, рибосома должна диссоциировать на субъединицы. Считается, что решающую роль в диссоциации и предотвращении реассоциации играют белки eIF1A и eIF3, которые взаимодействуют с 40S субъединицей — ее стороной, обращенной к 60S субъединице. Факторы eIF1 и eIF2 могут также присоединяться к комплексу, который обозначается как «нативная» 40S рибосомная частица.

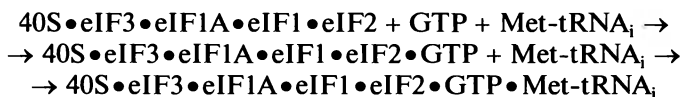
Этап 2. Согласно «классическому» сценарию, происходит активация белка eIF2 путем связывания ГТФ и последующее связывание инициаторной Met-tRNA_i с ГТФ-формой eIF2. Этот этап обычно рассматривается как взаимодействие трех свободных компонентов с образованием тройственного комплекса Met-tRNA_i•eIF2•GTP:



Тройственный комплекс присоединяется к «нативной» 40S частице:



Однако возможно, что *in vivo* eIF2 уже присоединен к «нативной» 40S частице, и формирование его комплекса с ГТФ и Met-tRNA_i происходит непосредственно на ней:



Сформированный комплекс часто обозначается как *инициаторный 43S рибосомный комплекс*.

Этап 3. Считается, что следующим этапом является связывание 43S инициаторного комплекса с мРНК, сканирование 5'-НТО и формирование так называемого *48S инициаторного комплекса* на инициаторном кодоне. Этот этап осуществляется при участии белков eIF4E, eIF4F, eIF4A и eIF4B и включает в себя первичную ассоциацию рибосомной частицы с мРНК (кэп-структурой или IRES), движение рибосомной частицы по 5'-НТО в направлении к 3'-концу и выбор кодона инициации.

Этап 4. Образовавшийся 48S инициаторный комплекс присоединяет 60S рибосомную субъединицу. Процесс обеспечивается белками eIF5 и eIF5B. Фактор eIF5 взаимодействует с 48S комплексом, индуцирует гидролиз ГТФ на eIF2, и ГДФ-форма белка eIF2 освобождается из комплекса с 40S субъединицей. Белок eIF5B, являющийся гомологом прокариотического IF2, в комплексе с ГТФ взаимодействует с 40S субъединицей и привлекает 60S субъединицу, которая индуцирует гидролиз ГТФ на eIF5B и уход eIF5B из рибосомы. Таким образом на инициаторном кодоне мРНК собирается 80S частица с Met-tRNA_i в *P*-участке.

Этап 5. Свободный *A*-участок 80S инициаторного комплекса связывает первую элонгаторную аминоацил-tRNA в форме ее тройственного комплекса с eEF1A и ГТФ. Последующее расщепление ГТФ освобождает eEF1A из рибосомы, что дает возможность осуществления реакции транспептидации между инициаторной Met-tRNA_i и первой элонгаторной аминоацил-tRNA. Образование первой пептидной связи завершает инициацию и начинает элонгацию.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 14

Barends, S., Bink, H. H. J., van den Worm, S. H. E., Pleij, C. W. A., and Kraal, B. (2003). Entrapping ribosomes for viral translation: tRNA mimicry as a molecular Trojan horse. *Cell* **112**: 123—129.

Clark, B. F. C., and Marcker, K. A. (1966). The role of N-formyl-methionyl-sRNA in protein biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **17**: 394—406.
Gallie, D. R., and Walbot, V. (1990). RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic

- virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Gen. Dev.* **4**: 1149—1157.
- Kopeina, G. S., Gromova, K. V., Shirokov, V. A., Vasiliev, V. D., and Spirin, A. S. (2008). Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Res.* **36**: 2476—2488.
- Kozak, M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **15**: 1109—1123.
- Kozak, M. (1980). Role of ATP in binding and migration of 40S ribosomal subunits. *Cell* **22**: 459—467.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**: 229—241.
- Macejak, D. G., and Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* **353**: 90—94.
- Oh, S.-K., Scott, M. P., and Sarnow, P. (1992). Homeotic gene *Antennapedia* mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Gen. Dev.* **6**: 1643—1653.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R., and Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol. Cell* **26**: 41—50.
- Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Belov, G. A., Sinyakov, A. N., Huang, M., Brown, T. D. K., and Agol, V. I. (1994). Starting window, a distinct element in the cap-independent internal initiation of translation on picornaviral RNA. *J. Mol. Biol.* **241**: 398—414.
- Shine, J., and Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342—1346.
- Shelton, E., and Kuff, E. L. (1966). Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **22**: 23—31.
- Siridechadilok, B., Fraser, C. S., Hall, R. J., Doudna, J. A., and Nogales, E. (2005). Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* **310**: 1513—1515.
- Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U. T., and Sarnow, P. (2000). Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* **102**: 511—520.
- Yoshida, T., Wakiyama, M., Yazaki, K., and Miura, K.-I. (1997). Transmission electron and atomic force microscopic observation of polysomes on carbon-coated grids prepared by surface spreading. *J. Electron Microscopy* (Japan) **46**: 503—506.

Обзоры и сборники

- Doudna, J. A., and Sarnow, P. (2007). Translation initiation by viral internal ribosome entry site. In: *Translational Control in Biology and Medicine* (eds. Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B.), pp. 129—153. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ehrenfeld, E. (1996). Initiation of translation by picornavirus RNAs. In *Translational Control* (eds. Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B.), pp. 549—574. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gualerzi, C. O., La Teana, A., Spurio, R., Canonaco, M. A., Severini, M., and Pon, C. L. (1990). Initiation of protein synthesis in Prokaryotes: Recognition of mRNA by ribosomes and molecular basis for the function of initiation factors. In *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 281—291. ASM Press, Washington, D. C.
- Hartz, D., McPheeters, D. S., and Gold, L. (1990). From polynucleotide to natural mRNA translation initiation: Function of *Escherichia coli* initiation factors. In *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 275—280. ASM Press, Washington, D. C.
- Jackson, R. J. (1996). A comparative view of initiation site selection mechanisms. In *Translational Control* (eds. Mathews,

- M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B.), pp. 71—112. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Jacobson, A. (1996). Poly(A) metabolism and translation: The closed-loop model. In *Translational Control* (eds. Hershey, J. W. B., Matthews, M. B., and Sonenberg, N.), pp. 451—480. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- McCarthy, J. E. G., and Brimacombe, R. (1994). Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation. *Trends Genet.* **10**: 402—407.
- McCarthy, J. E. G., and Gualerzi, C. (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* **6**: 78—85.
- Merrick, W. C., and Hershey, J. W. B. (1996). The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. In *Translational Control* (eds. Hershey, J. W. B., Matthews, M. B., and Sonenberg, N.), pp. 31—70. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Munroe, D., and Jacobson, A. (1990). Poly(A) is a 3' enhancer of translational initiation. In *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 299—305. ASM Press, Washington, D. C.
- Pestova, T. V., Lorsch, J. R., and Hellen, C. U. (2007). The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In: *Translational Control in Biology and Medicine* (eds. Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B.), pp. 87—128. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sonenberg, N., and Dever, T. E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 56—63.
- Trachsel, H. (1996). Binding of initiator methionyl-tRNA to ribosomes. In *Translational Control* (eds. Hershey, J. W. B., Matthews, M. B., and Sonenberg, N.), pp. 113—138. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Voorma, H. O. (1996). Control of translation initiation in prokaryotes. In *Translational Control* (eds. Hershey, J. W. B., Matthews, M. B., and Sonenberg, N.), pp. 759—777. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

15.1. Общие положения

В целом синтез белка в клетке может регулироваться на трех уровнях: 1) путем регуляции продукции мРНК (транскрипционный уровень); 2) через доступность мРНК для трансляции и модуляцию скорости трансляции мРНК (уровень трансляции); 3) путем регуляции деградации мРНК.

Хотя транскрипция и деградация мРНК также могут быть зависимыми от рибосомы процессами, здесь рассматривается только трансляционный уровень регуляции синтеза белка (как вопрос, имеющий непосредственное отношение к теме данной книги).

Основные механизмы трансляционной регуляции синтеза белка связаны с контролем инициации трансляции. В каждом данном конкретном условиях трансляция индивидуальной мРНК или цистрона полицистронной мРНК может начаться или не начаться; этот случай контроля инициации может быть назван «*все или ничего*» (all-or-none).

Если трансляция принципиально разрешена, то разные мРНК иницируют трансляцию с разными скоростями, т. е. мРНК показывают *различную «силу»* вовлечения в процесс трансляции. Более того, скорость инициации как в целом, так и для отдельных мРНК может быть *модулирована* в широком диапазоне с помощью внутренних или внешних сигналов, определяя регуляцию продукции белка в клетке.

И у прокариот, и у эукариот существуют хорошо развитые системы регуляции трансляции через контроль инициации. В то же время механизмы инициации трансляции и ее контроля у этих двух надцарств организмов настолько различны, что уместно рассматривать их по отдельности.

Общепринято, что у прокариот синтез белка контролируется в основном на уровне транскрипции. Действительно, метаболическая нестабильность мРНК в прокариотических клетках, в том числе высокие скорости ее синтеза и деградации, обеспечивают возможность быстрых изменений наборов матриц в зависимости от условий окружающей среды и наличия необходимых для клетки веществ. В то же время существование полицистронных матриц у прокариот часто требует дифференциального контроля активности индивидуальных цистронов, с тем чтобы обеспечить количественно разную или несопряженную продукцию белков, закодированных в данном матричном полинуклеотиде. Более того, в некоторых случаях накопление чрезмерных количеств продукта трансляции используется для выключения трансляции соответствующей мРНК (авторегуляция); таким способом может быть достигнут точный баланс между потребностью клетки в белке и уровнем его синтеза.

Таким образом, во многих случаях трансляционный уровень регуляции синтеза белка у прокариот может быть очень важным, хотя общий профиль продукции белка у этих организмов определяется в основном активностью генов, т. е. на уровне транскрипции.

15.2. Дискриминация мРНК

Дискриминация мРНК иницирующими рибосомными частицами — типичное регуляторное явление у прокариот. Иницирующие 30S рибосомные частицы узнают структурный элемент мРНК, называемый *рибосомосвязывающим участком* (RBS, *Ribosome Binding Site*), который содержит последовательность Шайна—Дальгарно и кодон инициации (см. подразд. 14.2.2). Первичная структура этого района и его доступность для взаимодействия с иницирующими рибосомными частицами наиболее важны для «силы» прокариотической инициации.

Доступность RBS зависит в первую очередь от вторичной и третичной структур мРНК. Внутримолекулярная укладка участка мРНК, включающего последовательность Шайна—Дальгарно и инициаторный кодон, если она достаточно стабильна, может полностью блокировать доступ рибосомных частиц к участку инициации (до тех пор, пока какие-либо конкурирующие взаимодействия не нарушат эту укладку). Обычно, однако, стабильность не так высока, и доступность RBS для рибосомных частиц определяется конкуренцией между формированием внутримолекулярной вторичной или третичной структуры и взаимодействием рибосомы с одноцепочечной мРНК. В любом случае наличие вторичной или третичной структуры в районе RBS уменьшает «силу» инициации. Чем более стабильна укладка, тем большего замедления скорости инициации следует ожидать. Отсутствие или низкая стабильность вторичной или третичной структуры в участке, прилегающем с 5'-конца к последовательности Шайна—Дальгарно и инициаторному кодону, также может вносить свой вклад в увеличение «силы» инициации.

Сродство 30S рибосомной частицы к доступному RBS зависит от степени комплементарности между последовательностью Шайна—Дальгарно и 3'-концевым участком 16S рРНК рибосомной частицы (см. подразд. 14.2.2). Расстояние между последовательностью Шайна—Дальгарно и кодоном инициации, природа инициаторного кодона (AUG или не AUG) и другие элементы структурного окружения могут также влиять на сродство. Что касается вклада последовательности Шайна—Дальгарно, для бактериальных мРНК наиболее типично наличие от четырех до шести спаренных оснований (A:U и G:C) между последовательностью мРНК и концом 16S рРНК. Мутации в последовательности Шайна—Дальгарно, ослабляющие комплементарность с 16S рРНК, приводят к уменьшению «силы» инициации. Более длинные последовательности Шайна—Дальгарно обычно обеспечивают большую «силу». Если участок между последовательностью Шайна—Дальгарно и кодоном инициации имеет длину больше 12 или меньше 5 нуклеотидов, «сила» инициации уменьшается. AUG может быть признан самым «сильным» среди всех инициаторных кодонов (GUG, UUG и т.д.). В случае редких кодонов инициации, таких как AUA и AUU, была показана совсем слабая инициация. Некоторые специальные последовательности («усилители» инициации) по направлению к 5'-концу от последовательности Шайна—Дальгарно могут ускорять инициацию — возможно, за счет комплементарных взаимодействий с экспонированными внутренними участками рибосомной РНК 30S субъединицы; предполагается, что они помогают мРНК «выуживать» рибосомные частицы из среды. Таким образом, разные мРНК имеют различную способность связывать иницирующие рибосомные субъединицы. Следовательно, когда мРНК конкурируют, «выигрывает сильнейший».

Действительно, в бактериальных клетках уровень экспрессии одних мРНК гораздо выше, чем других, по причине разных скоростей инициации. К числу мРНК с высокой экспрессией относятся в первую очередь те, которые кодируют «мажорные» (т. е. представленные в больших количествах) белки бактериальной клетки, в частности главные белки внешней мембраны (такие как липопроteid и белок Omp1 у *Escherichia coli*, многокопийная с-субъединица протонной АТФазы плазматической мембраны), рибосомные белки, факторы элонгации EF-Tu и EF-G. Как и следует ожидать, весьма экспрессируемы оказываются РНК бактериофагов, кодирующие белки оболочки. Нужно отметить некоторые особенно «сильные» (высокоэкспрессируемые) мРНК бактериофагов, такие как поздняя мРНК, транскрибируемая с гена 10 бактериофага Т7; ее UA-богатая последовательность, предшествующая последовательности Шайна — Дальгарно, — «эпсилон-мотив» (см. подразд. 14.2.2) — часто используется в конструировании искусственных мРНК в качестве усилителя инициации.

Синтез восьми различных видов белковых субъединиц, составляющих протонную АТФазу ($\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1a_1b_2c_{10-15}$), может служить хорошим примером корреляции эффективности инициации трансляции на различных кодирующих цистронах мРНК с необходимой стехиометрией субъединиц в ферментном комплексе. Пять видов субъединиц (α , β , γ , δ , ε) формируют растворимую часть фермента (F_1), в то время как связанная с мембраной часть (F_0) состоит из трех видов субъединиц (a , b , c). Все матрицы (цистроны), кодирующие субъединицы АТФазы, являются частями одного и того же полицистронного транскрипта *atp*, который начинается с цистрона *atpI*, кодирующего неизвестный белок; поэтому количество матриц эквивалентно и одинаково для каждой субъединицы:

<i>I</i>	<i>B</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>D</i>	<i>C</i>
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
?	a	c	b	δ	α	γ	β	ε

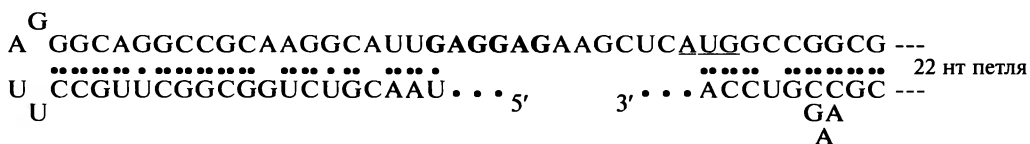
В то же время «сила» инициации трансляции для разных матриц (кодирующих цистронов) существенно различается; наиболее высокий уровень наблюдается в случае самой многокопийной субъединицы *c*, закодированной в цистроне *atpE*, а наиболее низкий — в случае матриц для субъединиц, представленных в комплексе одной копией, — *a* и γ , закодированных в цистронах *atpB* и *atpG* соответственно. Как было показано в прямых экспериментах *in vitro*, сродство 30S рибосомной субъединицы к RBS цистрона *atpE* действительно высоко, что может объясняться его открытой, неструктурированной и хорошо сбалансированной нуклеотидной последовательностью, в том числе наличием U-богатых и A-богатых участков (в этой и приведенных далее последовательностях полипуриновый участок Шайна — Дальгарно выделен полужирным шрифтом, а инициаторный кодон подчеркнут):

...UUUUAACUGAAACAACUGGAGACUGUCAUGGAAAACCUGAAUAUGGAU...

Напротив, RBS цистрона *atpB* содержит менее подходящую последовательность Шайна — Дальгарно; также нужно отметить, что расстояние между последней и кодоном инициации слишком мало:

...UAAAAGGCAUCAUGGCUUCAGAAAAUA...

С другой стороны, для цистрона *atpG* предсказывается существование стабильных вторичных структур как перед последовательностью Шайна — Дальгарно, так и в районе инициаторного кодона и дальше по цепи в направлении к 3'-концу:



Таким образом, доступность инициаторных районов различных матриц и их сродство к иницирующим рибосомным частицам в значительной мере определяют «силу» инициации и, следовательно, уровень продуктивности синтеза белков на данных матрицах. Синтез субъединиц протонной АТФазы может рассматриваться как пример фиксированного (конститутивного) трансляционного контроля, поддерживающего постоянные надлежащие пропорции продуктов белкового синтеза.

15.3. Трансляционное сопряжение

Полностью независимая инициация трансляции разных кодирующих последовательностей (цистронов) полицистронной мРНК, определяющая фиксированное соотношение закодированных в них белковых продуктов в соответствии с присущей цистронам «силой» инициации, является предельным случаем способа, которым рибосомы читают полицистронные мРНК. В большинстве случаев инициация трансляции последующего цистрона в той или иной степени зависит от трансляции предыдущего (*трансляционное сопряжение*). Случаи такой зависимой инициации трансляции на полицистронных мРНК могут быть подразделены на две группы.

1. **Инициация, индуцированная трансляцией предыдущего цистрона:** трансляция на предыдущем цистроне необходима для связывания свободных рибосомных частиц с RBS следующего цистрона и соответственно для инициации его трансляции. Здесь RBS следующего (внутреннего) цистрона может быть недоступен из-за вторичной и третичной структур, а расплетание мРНК в результате трансляции предыдущего цистрона открывает его и делает возможным связывание с ним свободных рибосом. Уже давно известен пример такой ситуации — это зависимость инициации синтеза фаговой репликазы от трансляции предыдущего цистрона белка оболочки в системах с использованием РНК бактериофагов типа MS2 или Q β (см. подразд. 15.3.1).

2. **Последовательная трансляция путем реинициации:** рибосомы связываются с мРНК только на предыдущем цистроне (на его RBS) и затем реиницируют на каждом последующем цистроне без диссоциации после терминации. В таких случаях свободные рибосомы не способны связываться с последующим цистроном и иницировать на нем трансляцию. В качестве типичного примера такого сценария можно привести случай полицистронных мРНК, кодирующих рибосомные белки (см. подразд. 15.3.2).

Три ситуации, отмеченные выше, схематически изображены на рис. 15.1. Встречаются также их комбинации и промежуточные ситуации. Например, независимая инициация на цистронах мРНК протонной АТФазы (см. подразд. 15.2) сопрово-

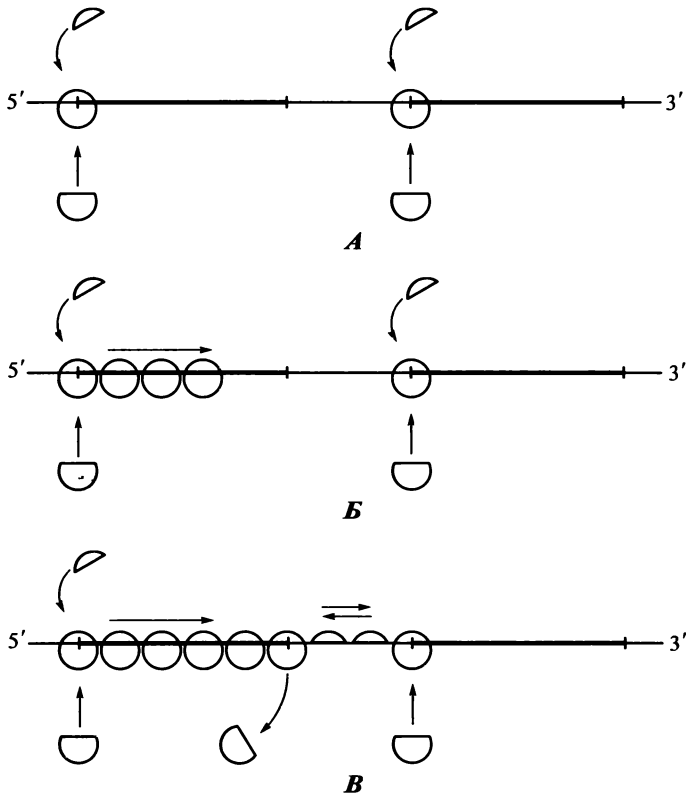


Рис. 15.1. Схематическое представление трех различных ситуаций при внутренней инициации на полицистронных мРНК бактерий.

A: независимая инициация на каждом цистроне.

Б: инициация на последующем цистроне индуцируется трансляцией предыдущего цистрона. Как правило, трансляция предыдущего цистрона разрушает взаимодействие между дальними (по цепи) участками мРНК и тем самым открывает рибосомосвязывающий участок последующего цистрона. **В:** реинициация. Трансляция на последующем цистроне не может быть иницирована свободными 30S субъединицами из-за неадекватного структурного окружения инициаторного участка. Вместо этого 30S субъединицы, завершившие трансляцию предыдущего цистрона и продолжающие скользить вдоль цепи мРНК без трансляции, реиницируют трансляцию на следующем цистроне

ждается неполным трансляционным сопряжением разной степени между некоторыми парами цистронов. Так, было показано, что инициация на цистроне *atpA* значительно усиливается трансляцией на предыдущем цистроне *atpH*, в то время как инициация на цистроне *atpG* усиливается трансляцией на предыдущем цистроне *atpA* лишь в незначительной степени.

15.3.1. Инициация, индуцированная трансляцией предыдущего цистрона

Когда полноразмерная полицистронная мРНК бактериофага MS2 (см. подразд. 15.4.1, рис. 15.4) сталкивается с бактериальными рибосомами, инициация происходит только на RBS второго цистрона *C*, кодирующего белок оболочки фага. Несмотря на наличие «сильной» последовательности Шайна—Дальгарно,

сильного кодона инициации (AUG), а также на оптимальное расстояние между ними, инициации на цистроне *S*, который кодирует субъединицу репликазы, не происходит. RBS цистрона *S* недоступен для рибосом в связи с его вовлечением в дальние взаимодействия с 5'-проксимальным участком РНК (см. далее, рис. 15.6, спираль I). Когда рибосомы, читающие цистрон *C*, достигают участка, вовлеченного в эти взаимодействия, они расплетают структуру и открывают RBS цистрона *S* для связывания со свободными рибосомами из среды.

Трансляция полицистронного транскрипта оперона *rplJ-rplL*, кодирующего рибосомные белки L10 и L7/L12 (см. подразд. 15.4.2, рис. 15.7), — еще один замечательный пример такого типа трансляционного сопряжения. Здесь RBS цистрона *rplL*, кодирующего белок L7/L12, блокирован дальними взаимодействия-

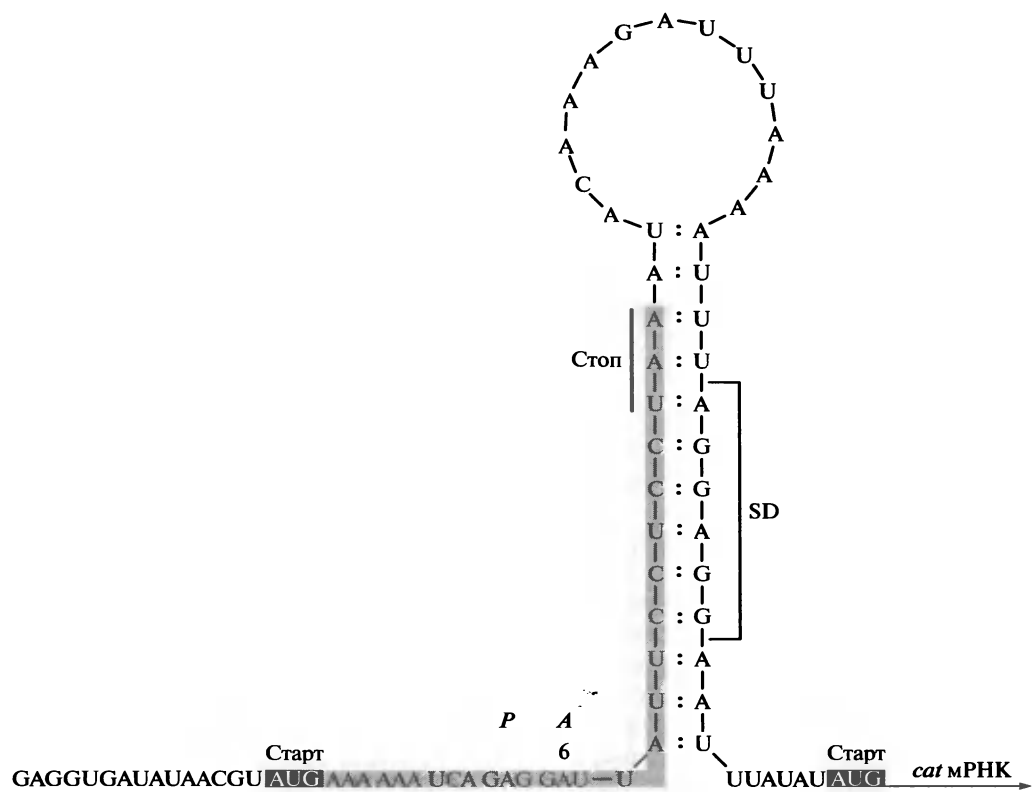
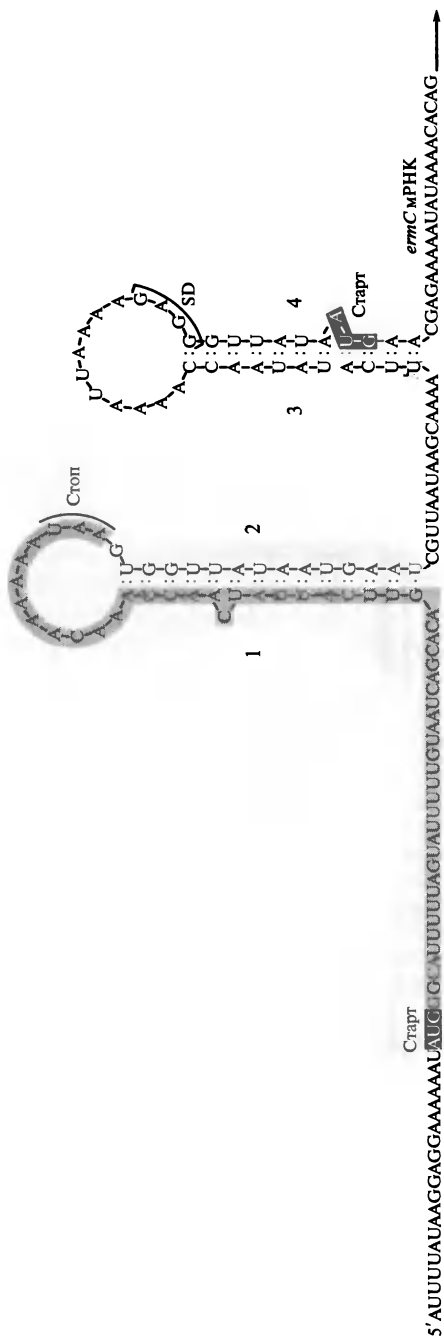


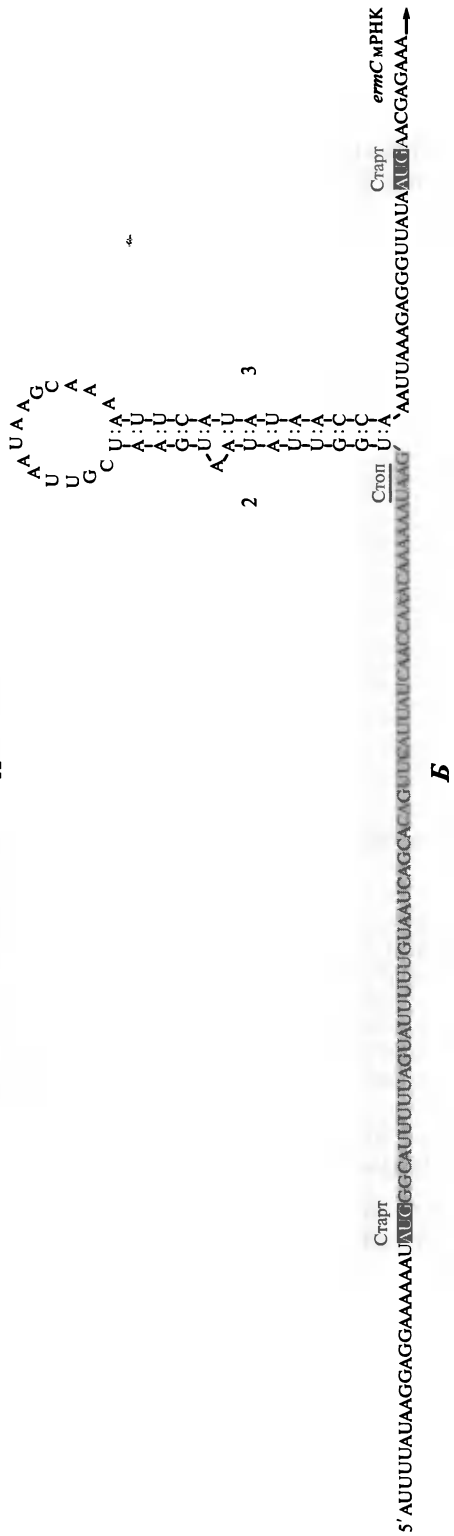
Рис. 15.2. Схема механизма индукции трансляции мРНК, кодирующей бактериальную хлорамфениколацетилтрансферазу (*cat* мРНК), хлорамфениколом.

Последовательность Шайна—Дальгарно (SD) этой мРНК блокирована стабильной вторичной структурой, образованной спариванием с концом предшествующей короткой открытой рамки считывания (sORF), так что независимая инициация трансляции мРНК невозможна. В отсутствие хлорамфеникола рибосомы транслируют предшествующую ORF вплоть до терминирующего кодона UAA и расплетают межцистроновую шпильку, но из-за слишком короткого расстояния между UAA и SD транслирующие и терминирующие рибосомы мешают иницилирующим субъединицам взаимодействовать с SD. В присутствии хлорамфеникола трансляция sORF ингибируется, и рибосомы останавливаются в середине sORF (по неизвестным причинам, предпочтительно на шестом кодоне); в этой ситуации межцистроновая шпилька оказывается уже расплетенной и рибосомосвязывающий участок *cat* мРНК открытым для инициации.

См. de Smit and van Duin (1990) *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **38**: 1—35



A



B

Рис. 15.3. Схема механизма регуляции трансляции мРНК, кодирующей бактериальную метилазу 23S рРНК (*erm* мРНК). Трансляция мРНК индуцируется эритромицином, что приводит к метилированию специфического нуклеотидного остатка в 23S рРНК (A2058), придавая рибосомам устойчивость к антибиотику.

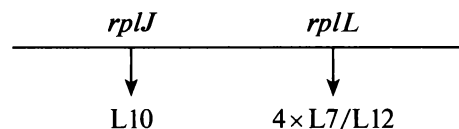
A: неактивная структура — в отсутствие эритромицина рибосомы транслируют лидерную открытую рамку считывания (sORF) и не могут иницировать трансляцию *erm*-цистрона из-за стабильного спаривания его рибосомосвязывающего участка (RBS, последовательность 4) с предшествующим межцистронным участком (последовательность 3).

B: активная структура — в присутствии эритромицина рибосомы, транслирующие лидерную sORF, останавливаются в середине этого цистрона, накрывая последовательность 1 и тем самым освобождая последовательность 2, которая спаривается с последовательностью 3, в результате чего последовательность 4 освобождается для инициации трансляции *erm*-цистрона.

См. de Smit and van Duin (1990) *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **38**: 1—35



ми этого участка с участком, расположенным на расстоянии более 500 нуклеотидов по направлению к 5'-концу РНК, в начале предыдущего цистрона *rplJ*, кодирующего белок L10; вследствие этого инициация на RBS свободными рибосомами невозможна. Когда рибосомы иницируют на цистроне *rplJ* и затем транслируют матрицу, они расплетают данную структуру и открывают RBS цистрона *rplL*. Было обнаружено, что открывающийся RBS гораздо «сильнее», чем RBS цистрона *rplJ*; поэтому RBS цистрона *rplL* после его открывания обеспечивает более эффективное связывание со свободными рибосомами и более высокий уровень инициации, чем предыдущий цистрон. В результате трансляции цистрона *rplL* образуется в четыре раза большее количество копий белка L7/L12, чем копий белка L10, образующихся при трансляции предыдущего цистрона *rplJ*:



Пропорция 4:1 соответствует молярному соотношению двух белков в рибосоме.

Перестройка вторичной структуры, приводящая к появлению открытого RBS, может индуцироваться не только активно транслирующими рибосомами, но и рибосомами, остановленными на специфических участках предыдущей кодирующей последовательности. Этот механизм иногда используется для регуляции синтеза некоторых факторов устойчивости к антибиотикам. Например, трансляция мРНК, кодирующей хлорамфениколацетилтрансферазу (Chloramphenicol Acetyl Transferase, CAT) — так называемую *cat* мРНК, — у ряда грамположительных бактерий индуцируется хлорамфениколом. Это происходит следующим образом. *Cat* мРНК является вторым цистроном двуцистронной матрицы и имеет недоступный RBS, вовлеченный в формирование стабильной шпильки за счет комплементарного взаимодействия с прилегающим концом предыдущего цистрона (рис. 15.2). Предыдущий цистрон кодирует короткий пептид и имеет открытый RBS. В отсутствие хлорамфеникола рибосомы транслируют первый цистрон, но не могут транслировать второй (*cat*): независимая инициация запрещена, и хотя трансляция первого цистрона открывает RBS *cat* мРНК, по причине короткого расстояния между участком терминации и RBS *cat* мРНК транслирующие и терминирующие рибосомы препятствуют связыванию свободных рибосом с откры-

тым RBS *cat* мРНК. В присутствии хлорамфеникола рибосомы, транслирующие первый цистрон, блокируются антибиотиком; рибосомы, остановившиеся в середине короткой кодирующей последовательности, поддерживают расплетенное состояние межцистронной шпильки и таким образом открывают RBS *cat* мРНК для инициации.

Другим примером может служить регуляция синтеза специфической метилазы, которая модифицирует нуклеотид A2058 в 23S рРНК и тем самым вызывает устойчивость бактериальных рибосом к эритромицину (а также к другим макролидам, линкозамидам и стрептограмину В) (см. подразд. 10.6). Модель регуляции заключается в следующем (рис. 15.3). Цистрону *erm*, кодирующему метилазу, предшествует, как и в предыдущем случае, короткая открытая рамка считывания. RBS цистрона *erm* формирует шпильку (обозначенную как шпилька 3—4). В отсутствие эритромицина рибосомы транслируют только предыдущий цистрон, который заканчивается другой шпилькой (шпилька 1—2), расположенной на некотором расстоянии до начала цистрона *erm*, и не открывают RBS цистрона *erm*. В присутствии антибиотика рибосомы, транслирующие предыдущий цистрон, блокируются в районе середины его кодирующей последовательности; в результате этого шпилька 1—2 расплетается и ее левая цепочка 1 покрывается задержанными рибосомами. В связи с комплементарностью между цепочкой 2 и цепочкой 3 шпильки 3—4 происходит перестройка вторичной структуры с образованием новой шпильки 2—3 и освобождением RBS цистрона *erm*. Теперь свободные рибосомы могут иницировать трансляцию на цистроне *erm* и начинать синтез метилазы.

15.3.2. Последовательная трансляция полицистронных матриц путем реинициации

Среди всех полицистронных мРНК *E. coli*, кодирующих рибосомные белки, самой длинной является мРНК, начинающаяся с матрицы белка S10 (см. далее, рис. 15.7). Она содержит кодирующие последовательности для 11 рибосомных белков. Однако иницирующие рибосомные частицы не могут связываться с ними независимо. Цистроны этой полицистронной мРНК транслируются строго последовательно: ассоциация с иницирующими рибосомными частицами происходит на первом цистроне (S10), где рибосомы иницируют трансляцию и двигаются дальше по цепи, а затем, после терминации, не диссоциируют из комплекса с матрицей, а переходят к инициации на следующем цистроне. Такая последовательная трансляция цистронов одной и той же полицистронной мРНК обеспечивает эквимоллярное соотношение продукции рибосомных белков, закодированных в ней. Похожая ситуация наблюдается с мРНК, начинающейся с матрицы для белка L14 (см. далее, рис. 15.7), но в этом случае последовательная трансляция начинается с цистрона белка L5, в то время как два предыдущих цистрона считываются независимо.

Для надежного и эффективного трансляционного сопряжения через терминацию и реинициацию необходимы, по крайней мере, три условия: во-первых, расстояние между участком терминации на предыдущем цистроне и участком реинициации должно быть коротким; во-вторых, стабильные вторичные или третичные структуры в межцистронном участке должны отсутствовать или легко расплетаться рибосомами, транслирующими предыдущий цистрон; в-третьих, перед

участком реинициации должна присуществовать последовательность Шайна — Дальгарно. Участки терминции и реинициации могут находиться в разных рамках считывания (фазах) на мРНК.

Интересно, что в некоторых случаях кодоны терминции и реинициации могут перекрываться; более того, RBS последующего цистрона может располагаться даже ближе к 5'-концу мРНК, чем кодон терминции предыдущего цистрона. Например, в полицистронном транскрипте *trp* оперона *E. coli* — *trpE-trpD-trpC-trpB-trpA* — существуют два примера соседствующих матриц с перекрывающимися кодонами терминции и инициации; это пары цистронов *trpE-trpD* и *trpB-trpA*, обе с межцистронным участком UGAUG. Соответственно трансляционное сопряжение надежно и гарантирует эквимоллярную продукцию полипептидов, которые являются компонентами одного ферментного комплекса. В трансляционно сопряженных цистронах VII и IX РНК бактериофага f1 кодон терминции UGA цистрона VII перекрывается с кодоном инициации цистрона IX на два нуклеотида, и последний расположен ближе к 5'-концу РНК, чем кодон терминции:

Met Ser...

VII...CAAAGAUGAGU...IX

...Gln Arg Stop

В полицистронной матрице *galE-galT-galK*, транскрибируемой с галактозно-го оперона, кодоны терминции и инициации в паре цистронов *galT-galK* разделены тремя нуклеотидами, с последовательностью Шайна — Дальгарно, расположенной ближе к 5'-концу по отношению к кодону терминции:

...GAA UCC GGA GUG UAA GAA AUG AGU...

Здесь также было показано, что трансляционное сопряжение является жестким и эффективным; это согласуется с тем фактом, что продукты цистронов *galT* и *galK* формируют ферментный комплекс с эквимоллярным соотношением двух белков (галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы и галактокиназы соответственно). Мутационный анализ показал, что инициация на цистроне *galK* ухудшается, если терминция на предыдущем цистроне происходит вне участка инициации (далее по направлению к 5'-концу от последовательности Шайна — Дальгарно или к 3'-концу от кодона инициации), и чем больше расстояние между ними, тем меньше эффективность реинициации.

В четырехцистронной РНК бактериофага MS2 трансляция цистрона *L*, кодирующего пептид лизиса, также тесно сопряжена с трансляцией предыдущего цистрона белка оболочки (*C*). По структурным причинам (вовлечение RBS в относительно стабильную вторичную структуру; см. далее, рис 15.6, спираль II) независимая инициация на цистроне *L* невозможна. Было показано, что терминция на цистроне *C* абсолютно необходима для инициации (реинициации) на цистроне *L*. В то же время эффективность реинициации в данном случае мала, что приводит к значительно более слабой продукции пептида лизиса по сравнению с белком оболочки. Это согласуется с относительно большим расстоянием между кодоном терминции цистрона *C* и районом инициации цистрона *L*; последний располагается на расстоянии более 40 нуклеотидов по направлению к 5'-концу от кодона терминции UAA цистрона *C* (см. далее, рис. 15.5).

Таким образом, последовательная сопряженная трансляция полицистронных мРНК предполагает, что рибосомные частицы (скорее всего, 30S субъединицы) после терминации способны к «беспорядочному блужданию» по мРНК в районе участка терминации в направлении как к 5'-, так и к 3'-концу от него. Физическая природа этого феномена — по всей видимости, латеральная одномерная диффузия нетранслирующих связанных с мРНК рибосомных частиц по мРНК. Если им встречается структурно доступный участок инициации, включая последовательность Шайна — Дальгарно и инициаторный кодон (на должном расстоянии друг от друга), они реиницируют трансляцию. Если участок инициации перекрывается с кодоном терминации предыдущего цистрона, эффективность реинициации может быть очень высокой, вплоть до 100 %; в этом случае образуются эквимольные количества закодированных в данных цистронах полипептидов. В то же время существует высокая вероятность диссоциации нетранслирующих частиц из комплекса с мРНК во время «беспорядочного блуждания», так что чем больше расстояние между кодоном терминации предыдущего цистрона и RBS последующего, тем ниже эффективность реинициации. Другой причиной уменьшения эффективности реинициации может быть слабый RBS. Поэтому даже в случае тесного сопряжения (сильная зависимость трансляции внутреннего цистрона от трансляции предыдущего) эффективность реинициации может изменяться в зависимости от природы межцистронного участка: во многих случаях значительное количество терминировавших рибосом диссоциируют из комплекса с мРНК, и только небольшая часть частиц осуществляет реинициацию. Соответственно продукция белка, закодированного в последующем цистроне, меньше белковой продукции предыдущего цистрона.

В целом реинициация ассоциированными с мРНК рибосомными частицами более эффективна, чем инициация *de novo* свободными рибосомами. Именно поэтому для реинициации могут быть использованы относительно слабые или не совсем доступные участки инициации, на которых инициация свободными рибосомами происходит неэффективно или же не происходит совсем. Даже если RBS спрятан в стабильную вторичную структуру, терминация на предыдущем цистроне внутри RBS позволяет терминирующим рибосомам, по крайней мере в ряде случаев, сразу связываться с инициаторными последовательностями (SD или AUG). Это может указывать на возможность непосредственной перестройки терминаторного комплекса с образованием инициаторного комплекса.

15.4. Трансляционная репрессия

Исключая случаи регуляции синтеза некоторых факторов устойчивости к антибиотикам, таких как хлорамфениколацетилтрансфераза и 23S рРНК-метилаза (см. подразд. 15.3.1), все описанные ранее механизмы контролируют трансляцию путем установления фиксированных (конститутивных) скоростей инициации на разных мРНК и их функциональных частях (цистронах). Напротив, механизмы репрессии с участием специальных мРНК-связывающих белков, называемых *трансляционными репрессорами*, обеспечивают возможность регуляции скоростей инициации в широком диапазоне в зависимости от внешних сигналов (как правило, низкомолекулярных или высокомолекулярных лигандов, называемых *эффекторами*), а также регуляции типа обратной связи, или *ауторегуляции* (подавление синтезированным белком трансляции собственной мРНК).

Основной механизм трансляционной репрессии заключается в прямом связывании репрессорного белка с RBS на мРНК. Этот белок конкурирует с рибосомами за взаимодействие с RBS. Если участок связывания с рибосомой располагается внутри нестабильного элемента вторичной структуры, репрессорный белок может стабилизировать эту структуру и, тем самым, препятствовать взаимодействию RBS с иницилирующими рибосомами. Иногда репрессорный белок связывается с последовательностями, не входящими в состав RBS, и индуцирует перестройки вторичной или третичной структуры, в результате которых RBS становится закрытым и недоступным для иницилирующих рибосом. Участок мРНК, с которым связывается репрессор, может быть назван *трансляционным оператором*.

15.4.1. Регуляция трансляции РНК бактериофага MS2

Бактериофаг MS2 имеет сферическую форму; его диаметр составляет 250 Å, молекулярная масса $3,6 \cdot 10^6$ Да. Фаговая частица содержит 180 субъединиц белка оболочки (каждая молекулярной массой 14,7 кДа), одну молекулу так называемого белка А молекулярной массой 38 кДа и одну молекулу РНК молекулярной массой 10^6 Да. После инфицирования клеток *E. coli* (или в бесклеточной системе трансляции) фаговая РНК служит матрицей для синтеза белка оболочки (С, Coat protein), белка А, пептида лизиса (L, Lysis protein) и субъединицы РНК-репликазы (R, или S, Synthetase protein) с молекулярной массой 62 кДа (эта субъединица и пептид лизиса не являются компонентами фаговой частицы). Расположение на цепи РНК фага соответствующих цистронов, А, С, L и S, схематически изображено на рис. 15.4.

Цепь РНК начинается гуаниловым нуклеотидом с трифосфатом в 5'-положении (pppG). Затем следует некодирующая последовательность длиной 129 нуклеотидных остатков; эта последовательность содержит триплеты AUG и GUG, которые, однако, не используются в качестве инициаторных кодонов. Первый инициаторный кодон — это GUG, который служит началом кодирующей последовательности цистрона А, соответствующего белку А. Цистрон А состоит из 1179 нуклеотидных остатков и заканчивается триплетом терминации UAG, за которым расположен некодирующий участок длиной 26 нуклеотидов. Следующий за ним цистрон С, кодирующий белок оболочки, начинается триплетом AUG и содержит 390 нуклеотидных остатков. Этот цистрон заканчивается кодоном UAA; после него следует второй кодон терминации, UAG. Цистрон С отделен 36 нуклеотидами от цистрона S, кодирующего субъединицу РНК-репликазы. Цистрон S начинается с AUG, имеет длину 1635 нуклеотидных остатков и заканчивается кодоном

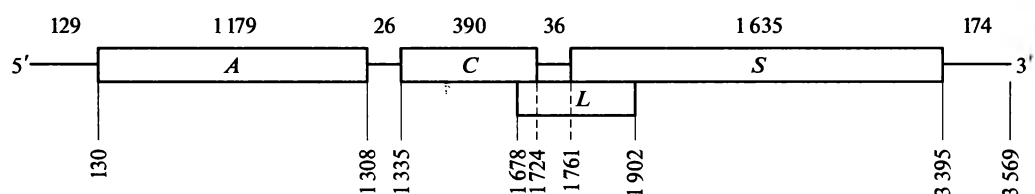


Рис. 15.4. Схема расположения кодирующих последовательностей (цистронов) в РНК бактериофага MS2.

Fiers et al. (1976) *Nature* 260: 500—507. Kastelein et al. (1982) *Nature* 295: 35—40

UAG. На расстоянии одного нуклеотида от сигнала терминации (т.е. вне рамки считывания) имеется еще один терминирующий триплет, UGA. 3'-Концевая не кодирующая последовательность состоит из 174 нуклеотидных остатков и заканчивается аденозином.

В дополнение к трем последовательно расположенным цистронам *A*, *C* и *S*, отделенным друг от друга межцистронными участками, существует еще и четвертая кодирующая последовательность, *L*, перекрывающая цистроны *C* и *S* и находящаяся в другой рамке считывания (рис. 15.5); она кодирует пептид лизиса, или белок *L*. Этот белок участвует в лизисе хозяйской клетки на поздних стадиях инфекции. Цистрон *L* начинается в концевом участке цистрона *C*, включает в себя 36-нуклеотидную последовательность, разделяющую цистроны *C* и *S*, и заканчивается внутри цистрона *S*. Рамка считывания цистрона *L* сдвинута вправо на одно основание (сдвиг +1), так что он не транслируется во время синтеза белка *S* или белка *C*. Цистрон *L* содержит свой собственный инициаторный кодон AUG, который находится вне рамки считывания триплетов цистрона *C*, а также свой собственный кодон UAA, также расположенный в другой рамке по сравнению с кодонами цистрона *S*.

Три последовательно расположенных цистрона *A*, *C* и *S* содержат сильные RBS, и их трансляция иницируется свободными рибосомами независимо от терминации на предыдущем цистроне. В отличие от них цистрон *L* транслируется только в результате малоэффективной реинициации после терминации трансляции на цистроне *C* и последующего «беспорядочного блуждания» нетранслирующей рибосомной частицы вдоль цепи РНК (см. подразд. 15.3.2). Несмотря на высокий «инициаторный потенциал» каждого из цистронов *A*, *C* и *S*, они сильно зависят друг от друга в своей трансляции. Как уже отмечалось, цистроны *A* и *S* на нетранслируемой РНК фага MS2 не способны связываться с рибосомами, так как их RBS вовлечены в образование стабильных вторичных и третичных структур РНК. Только RBS цистрона *C* открыт для взаимодействия со свободными рибосомными частицами и соответственно может быть использован для инициации трансляции независимо от трансляции других цистронов.

В соответствии с вышеизложенным, трансляция РНК фага MS2 начинается с инициации синтеза белка оболочки. После начала трансляции цистрона *C* рибосомы движутся вдоль него по направлению к цистрону *S* и расплетают структуру РНК по мере своего продвижения. Это приводит к открыванию участка инициации цистрона *S* (рис. 15.6) (см. также подразд. 15.3.1). Таким образом, еще до окончания трансляции цистрона *C* первой рибосомой и синтеза первой полноразмерной молекулы белка оболочки участок инициации цистрона *S* становится доступным для свободных рибосомных частиц, и происходит инициация синтеза субъединицы РНК-репликазы.

Для формирования активной молекулы РНК-репликазы продукт трансляции цистрона *S* должен связаться с тремя белками хозяйской клетки. Два из этих белков — факторы элонгации EF-Tu и EF-Ts, а третий — рибосомный белок S1. Другими словами, полная активная РНК-репликаза представляет собой белок с четвертичной структурой, состоящий из четырех различных субъединиц (R, S1, EF-Tu и EF-Ts), и только одна из них (R, или S) закодирована в РНК фага. По своему механизму действия фермент является узкоспецифической РНК-зависимой РНК-полимеразой, использующей исходную («+») цепочку РНК фага MS2 для синтеза комплементарной ей «антисмысловой» (или «-») цепочки; эти новосинтезированные комплементарные («-») цепи используются затем в качестве

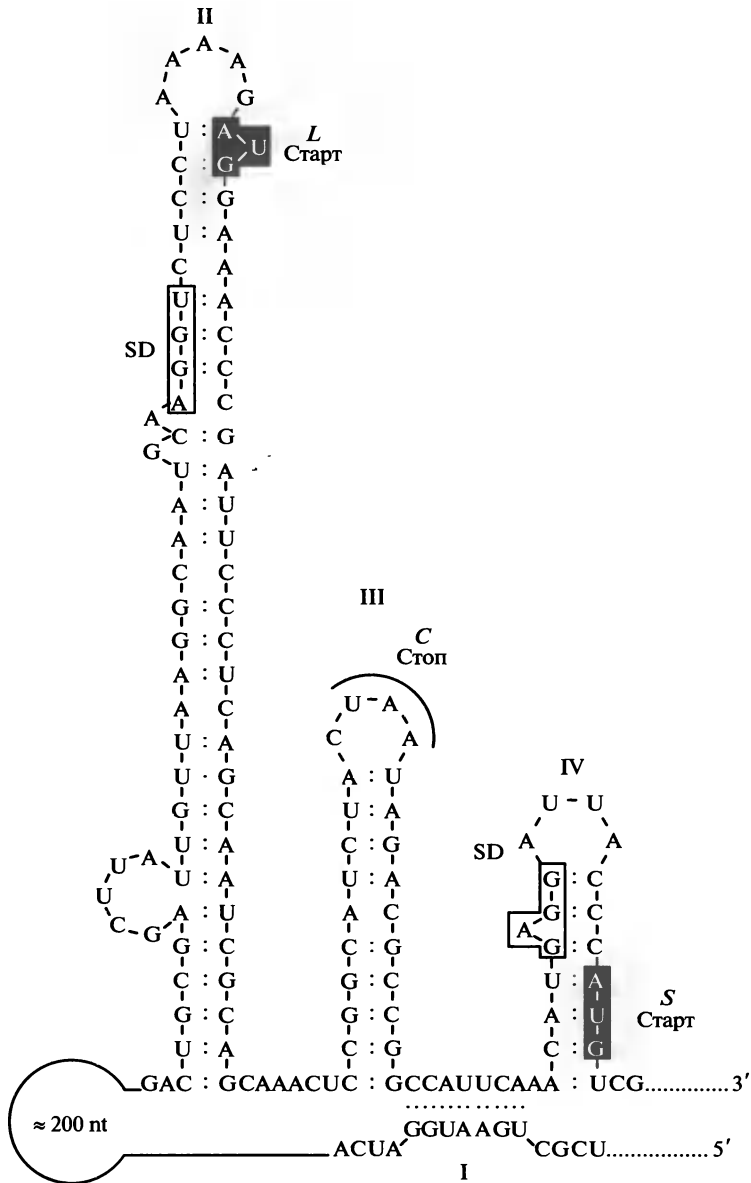


Рис. 15.6. Схема предсказанной вторичной структуры района фаговой (MS2) РНК, участвующего в регуляции трансляции цистронов *L* и *S*.

Пояснения см. в тексте.

См. de Smit and van Duin (1990) *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **38**: 1–35

матрицы для синтеза большого числа копий «смысловой» («+») цепи, на которых собираются новые фаговые частицы.

Было обнаружено, что фаговая РНК-репликаза выполняет и еще одну важную функцию в ходе фаговой инфекции: она специфически узнает RBS цистрона *C*, связывается с ним и тем самым блокирует инициацию, т.е. служит «по совместительству» репрессором трансляции этого цистрона. Репрессия происходит уже на

ранних стадиях инфекции, когда в результате трансляции цистрона *S* и сборки фермента появляются первые молекулы репликазы. Репрессия трансляции цистрона *C* на данной стадии помогает избежать конфликтной ситуации, когда РНК в одно и то же время служила бы матрицей как для трансляции рибосомами (которые читают ее от 5'- к 3'-концу), так и для репликации ферментом (направление считывания которым противоположно — от 3'- к 5'-концу). Репрессия цистрона *C* РНК-репликазой позволяет уже транслирующим рибосомам дочитать РНК, но препятствует новой инициации и, таким образом, «очищает» РНК от рибосом. В результате продолжающейся репликации образуются новые молекулы РНК, которые начинают количественно преобладать над молекулами репликазы, так что на нерепрессированных цистронах *C* возобновляется синтез молекул белка оболочки.

Завершение трансляции цистрона *C* первыми рибосомами приводит к появлению в системе свободных молекул белка оболочки. По мере продолжения трансляции и появления все новых молекул РНК фага MS2, доступных для трансляции, этот белок накапливается; в конечном счете он используется для самосборки готовых фаговых частиц. Однако белок оболочки также обладает и другой дополнительной функцией: он имеет сильное специфическое сродство к участку РНК фага между цистронами *C* и *S*, включая RBS цистрона *S* (см. рис. 15.6). Белок связывается с этим участком (оператором) и подавляет инициацию трансляции цистрона *S*. Вероятно, репрессия происходит вследствие стабилизации лабильной вторичной структуры (см. рис. 15.6, спираль IV) белком оболочки фага, из-за чего последовательность Шайна — Дальгарно и кодон инициации цистрона *S* становятся недоступными для рибосом. Следовательно, после того как трансляция цистрона *S* была разрешена трансляцией предыдущего цистрона, происходит репрессия инициации трансляции цистрона *S* вследствие накопления белкового продукта трансляции предыдущего цистрона. Репрессия дальнейшего синтеза этого белка предотвращает суперпродукцию фермента. Белок оболочки фага, являющийся репрессором цистрона *S*, выполняет, таким образом, регуляторную функцию в трансляции.

Цистрон *A* не может транслироваться до тех пор, пока не начнется репликация РНК фага MS2. Его участок инициации «спрятан» за счет вторичной и третичной структур интактной РНК. Некоторыми искусственными воздействиями (такими как частичная нуклеазная или тепловая деградация исходной полинуклеотидной цепи, обработка формальдегидом, разрушающим спаривание оснований, и т. п.) можно добиться инициации трансляции на этом цистроне. В процессе репликации, в начале формирования «+» цепи, когда цепь продолжает расти, пространственная структура 5'-концевого участка, содержащего RBS цистрона *A*, в течение какого-то времени еще не сформирована. Очевидно, именно этот момент используется для инициации трансляции цистрона *A* в нормальных условиях. Поскольку в готовой вирусной частице содержится всего одна молекула белка *A* на 180 молекул белка оболочки, то сравнительно короткого промежутка времени, в течение которого возможна инициация трансляции цистрона *A*, оказывается достаточно для необходимой продукции белка *A*. Затем синтезируемая РНК фага MS2 сворачивается так, что участок инициации цистрона *A* оказывается вовлечен в формирование трехмерной структуры, которая и делает RBS недоступным для свободных рибосом.

Таким образом, трансляция РНК фага MS2 — пример сочетания нескольких различных систем регуляции. Прежде всего, взаимодействие молекулы РНК-ре-

пликазы с участком инициации цистрона *S* представляют собой типичные случаи трансляционной репрессии. Кроме того, в ходе экспрессии полицистронной РНК фага MS2 наблюдается трансляционное сопряжение через открывание RBS вследствие трансляции предыдущего цистрона (см. подразд. 15.3.1) и через реинициацию (см. подразд. 15.3.2), а также сопряжение трансляции (цистрона *A*) с репликацией.

15.4.2. Регуляция трансляции мРНК рибосомных белков

В норме бактериальные клетки не допускают избыточной продукции рибосомных белков — их синтезируется столько, сколько требуется для сборки рибосом, в соответствии с количеством образующейся рибосомной РНК. Координированная продукция практически всех рибосомных белков достигается несмотря на то, что их гены вовсе не организованы в единый регулируемый блок, а представлены приблизительно 16 независимыми оперонами, распределенными по клеточному геному. Одинаковый уровень синтеза всех рибосомных белков и отсутствие их избыточной продукции поддерживается регуляторным механизмом, обеспечивающим репрессию трансляции избытком белка (регуляция трансляции по принципу обратной связи).

Значительная часть генов рибосомных белков (31 из 52) располагается в двух главных группах (кластерах): одна в районе *str-spc* на 72 мин и другая в районе *rif* на 89 мин кольцевой хромосомы *E. coli*. Район *str-spc* содержит 4 оперона, кодирующие 27 рибосомных белков, а также факторы элонгации (EF-Tu и EF-G) и α -субъединицу РНК-полимеразы. Район *rif* содержит два оперона, кодирующих четыре рибосомных белка, а также β - и β' -субъединицы РНК-полимеразы. Каждый оперон транскрибируется в полицистронную мРНК. Цистроны и их последовательность в этих полицистронных мРНК схематически изображены на рис. 15.7. Было показано, что для каждой из вышеназванных полицистронных мРНК один из продуктов трансляции, а именно один из кодируемых рибосомных белков, является также репрессором трансляции данной мРНК (символы этих белков-репрессоров на рис. 15.7 обведены кружками). Эффект репрессии был обнаружен как в экспериментах *in vivo*, так и в бесклеточных системах. В опытах *in vivo* было показано, что синтез рибосомных белков, кодируемых соответствующей мРНК, подавлялся при избыточной продукции одного из белков. Индукция белков S7, L4, S8, S4, L1 или L10 приводила к ингибированию синтеза тех и только тех белков, которые кодируются полицистронной мРНК, содержащей цистрон данного белка. Эксперименты *in vitro* дали еще более прямые результаты: добавление одного из вышеперечисленных белков (S7, L4, S8, S4, L1 или L10) в бесклеточную систему трансляции приводило к избирательному подавлению синтеза именно того ряда белков, который кодируется полицистронной мРНК, содержащей цистрон, соответствующий добавленному белку.

Однако синтез некоторых белков, закодированных в перечисленных выше полицистронных мРНК, не подавляется при добавлении репрессорных рибосомных белков. Так, белок S12 продолжал синтезироваться после добавления белка S7 в бесклеточную систему, или после избирательной индукции белка S7 *in vivo*. Точно так же белки L14 и L24 не прекращали синтезироваться и после добавления

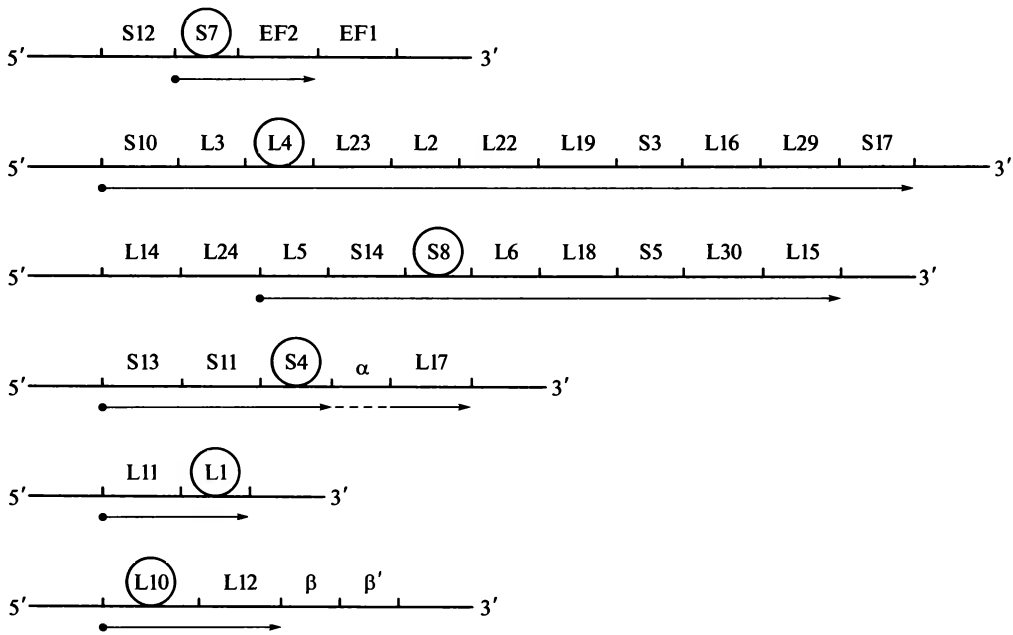


Рис. 15.7. Схематическое представление последовательного расположения цистронов, кодирующих рибосомные белки, вдоль цепей полицистронных мРНК (транскриптов соответствующих оперонов).

α , β и β' — цистроны, кодирующие соответствующие субъединицы бактериальной РНК-полимеразы. Стрелки под последовательностями цистронов начинаются с цистрона, на который действует белок-репрессор, и продолжают до цистрона, до которого продолжается действие репрессора. Белки-репрессоры обозначены их символами в кружках; эти белки связываются с полицистронной мРНК в начале цистронов, с которых начинаются стрелки.

См. Dean and Nomura (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3590—3594. Nomura et al. (1982) in *Interaction of Translational and Transcriptional Controls in the Regulation of Gene Expression* (Grunberg-Manago and Safer, eds.), pp. 91—101, Elsevier, New York

или индукции белка S8. Примечательно, что цистроны белков, синтез которых не регулируется белком S7 или S8, находятся вблизи от 5'-концов соответствующих полицистронных мРНК.

Для объяснения приведенных фактов было выдвинуто предположение (вскоре получившее прямые экспериментальные подтверждения), что репрессорный белок специфически связывается с участком инициации одного из начальных цистронов полицистронной мРНК и блокирует трансляцию как данного цистрона, так и всех последующих, расположенных далее по направлению к 3'-концу. Например, белок S8 связывается с началом цистрона белка L5, в результате чего происходит репрессия трансляции всех последующих (но не предыдущих) цистронов. Следовательно, в этих случаях свободные рибосомы не способны инициировать трансляцию на каждом цистроне независимо, происходит *последовательная трансляция через реинициацию*: рибосомы, терминировавшие на предыдущем цистроне, не диссоциируют из комплекса с матрицей, а переходят непосредственно к реинициации на следующем цистроне. Очевидно, что эффективность реинициации в подобных случаях должна приближаться к 100%. Тогда такая последовательная трансляция обеспечивает эквивалентную продукцию рибосомных белков, кодируемых данной полицистронной мРНК.

В тех же самых полицистронных мРНК имеются и исключения. Так, показано, что трансляция цистронов EF-Tu и субъединиц β , β' и α РНК-полимеразы не репрессируется белками S7, L10 и S4 (см. рис. 15.7). Следовательно, инициаторные участки этих цистронов могут, по-видимому, связываться со свободными рибосомами, в результате чего происходит независимая инициация трансляции. С другой стороны, известно, что продукция белка L7/L12 в четыре раза выше, чем продукция белка L10, в соответствии с их пропорцией в рибосоме; здесь имеет место независимая инициация трансляции на цистроне белка L7/L12, причем «сила инициации» этого цистрона оказывается существенно выше, чем у цистрона белка L10. В то же время, как уже отмечалось ранее, белок L10 репрессирует трансляцию как цистрона L10, так и цистрона L7/L12: репрессия трансляции цистрона белка L10 предотвращает открывание RBS следующего цистрона, кодирующего белок L7/L12 (см. подразд. 15.3.1).

Особый интерес представляет установление места посадки и механизма действия рибосомных белков-репрессоров на полицистронных мРНК. Было показано, что если начало структурного гена белка S13 и предшествующая ему нуклеотидная последовательность удалены с помощью делеционной мутации, то белок S4 не репрессирует трансляцию соответствующей полицистронной мРНК (рис. 15.7, четвертая сверху). Наоборот, белок S7 репрессирует свою собственную трансляцию даже в том случае, если отсутствует начало его полицистронной мРНК (см. рис. 15.7, первая сверху), включая цистрон белка S12. Белок L1 оказывает репрессорное действие на свою бицистронную мРНК (см. рис. 15.7, пятая сверху) только при наличии 5'-концевой последовательности, предшествующей цистрону белка L11. Отсюда следует, что участок посадки репрессорного белка должен быть расположен в начале именно того цистрона, с которого начинается репрессия последовательной трансляции полицистронной мРНК. Для белка S7 этот участок должен быть расположен где-то между цистронами белков S12 и S7 или в начале цистрона S7; для белка S4 — перед цистроном белка S13 или в его начале; для белка L1 — перед цистроном белка L11. Рассуждая аналогично, можно предположить, что участок репрессорного действия для белка L4 должен находиться перед цистроном белка S10 или в его начале; для белка L10 — перед началом или в начале его собственного цистрона; для белка S8 — между цистронами белков L24 и L5 или в начале цистрона белка L5.

Известно, что рибосомные белки S4, S7, S8, L1 и L4 играют важную роль в структуре рибосомы и ее самосборке: они являются «сердцевинными» белками и довольно прочно связываются со специфическими участками рибосомной РНК (см. подразд. 7.5). Участки посадки этих белков на рибосомных РНК хорошо установлены и структура их определена. Уже с самого начала после открытия репрессорной функции рибосомных белков были все основания предполагать, что рибосомные белки, выступая в роли репрессоров, связываются с мРНК теми же специфическими РНК-связывающими центрами, которые участвуют во взаимодействии с рибосомной РНК. В таком случае структуры участков рибосомной РНК и мРНК, связывающих данный рибосомный белок, должны быть похожи. Действительно, сравнение первичных структур и предсказания вторичных структур белоксвязывающего участка рибосомной РНК и операторного района мРНК показали, по крайней мере в некоторых случаях, их подобие. Другими словами, складывалось представление, что операторные участки мРНК могут имитировать белоксвязывающие участки рибосомных белков на рибосомной РНК. Прямое доказательство такого механизма трансляционной репрессии посредством связывания

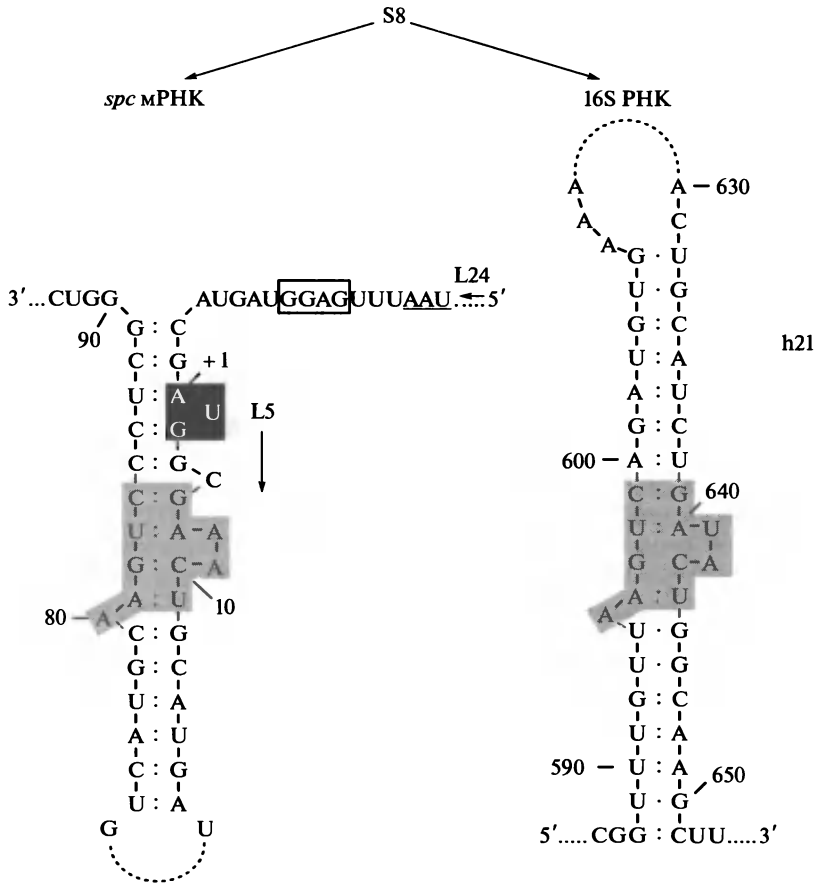


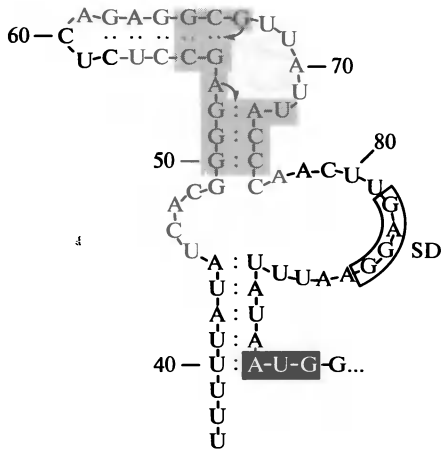
Рис. 15.8. Сравнение вторичных структур района полицистронной мРНК в месте стыка кодирующих последовательностей рибосомных белков L24 и L5, узнаваемого рибосомным белком S8 как репрессором (слева), и района 16S рРНК, узнаваемого белком S8 при сборке рибосомной частицы (справа).

Гомологичные участки выделены серым фоном, инициаторный кодон цистрона белка L5 в мРНК — черным фоном, SD-последовательность цистрона белка L5 заключена в рамку. Рентгеноструктурный анализ комплексов белка S8 с соответствующими фрагментами мРНК и 16S рРНК показал, что, как и ожидалось, разница в ориентациях нуклеотидных последовательностей (противоположная ориентация) не оказывает структурного эффекта.

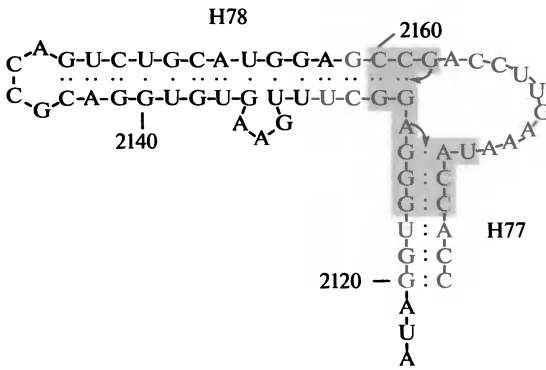
См. Merianos et al. (2004) *RNA* 10: 954—964

вания рибосомного белка с участком мРНК, имитирующим посадочное место этого белка на рибосомной РНК, было получено путем рентгеноструктурного анализа соответствующих РНК-белковых комплексов (Мур и др., 2004; Никонов и др., 2005, 2006).

В качестве примера на рис. 15.8 приведено сравнение первичной и вторичной структур межцистронного участка L24-L5 и начала цистрона белка L5 как места связывания репрессорного белка S8 на *spc* мРНК (см. рис. 15.7, третья сверху), с одной стороны, и спирали h21 16S рРНК, связывающей белок S8 в рибосоме. На рисунке видна почти полная гомология средних районов (отмеченных серым фоном) шпильки в начале кодирующей последовательности белка L5 (*spc* мРНК) и



мРНК



23S рНК

Рис. 15.9. Сравнение вторичных структур лидерного района бицистронной мРНК, кодирующей рибосомные белки L11 и L1, узнаваемого рибосомным белком L1 как репрессором, и района 23S рибосомной рНК, узнаваемого белком L1 при сборке рибосомной частицы.

Гомологичные участки выделены серым фоном, инициаторный кодон цистрона белка L11 в мРНК — черным фоном, SD-последовательность цистрона белка L11 заключена в рамку. Структуры представлены по данным рентгеноструктурного анализа комплексов белка L1 с соответствующими фрагментами мРНК и 16S рРНК.

См. Nevskaya et al. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**: 478—485

шпильки 16S рРНК (при противоположной ориентации их нуклеотидных последовательностей, что никак не должно нарушать сходства пространственных структур соответствующих районов).

В рибосоме белок S8 контактирует со спиралями h19, h20, h21, h25 и h26a, но основным местом взаимодействия является средний район спирали h21, с контактами через нуклеотидные остатки 585—600/640—644. Согласно данным рентгеноструктурного анализа комплекса белка S8 с фрагментом мРНК, основные контакты мРНК с белком устанавливаются через нуклеотидные остатки C79—C86, A7—A9 и G12. Таким образом, в обоих случаях именно район гомологии оказывается задействованным в связывании белка S8 с рНК.

На рис. 15.9 показана структурная гомология между лидерной последовательностью бицистронной мРНК, кодирующей белки L11 и L1 (см. рис. 15.7, пятая сверху), для которой репрессором служит двухдоменный белок L1, и участком 23S рРНК, где белок L1 локализуется на рибосоме. На стыке двух спиралей — H77 и H78 — в рибосомной РНК и похожих на них спиралей в лидерной последовательности мРНК имеется петля, которая участвует в формировании резкого (90°) поворота одной спирали относительно другой («излом»). Рентгеноструктурный анализ комплексов белка L1 с соответствующими фрагментами рибосомной РНК и мРНК (Никонов, Пиндль и др., 2005) показал, что белок L1 в обоих случаях связывается с РНК в месте стыка спиралей. Следует отметить, что белок довольно прочно связывается с рибосомной РНК обоими своими доменами — одним преимущественно со спиралью H77 (главные контакты с G2124, G2125 и C2174, а также G2127 на торце H78), а другим — с петлей на границе между спиральями H77 и H78. В отличие от рибосомного комплекса L1 • rRNA связывание белка L1 с мРНК осуществляется в основном за счет одного домена (контакты с G51, G52 и C74, а также G54 на торце соседней шпильки), а укороченная петля в соответствующем месте мРНК имеет мало контактов с другим доменом белка. Последнее объясняет существенно большую стабильность комплекса белка L1 с рибосомной РНК по сравнению с его комплексом с мРНК — константа сродства РНК — белок в этих комплексах различается почти на порядок величины.

В рассмотренных выше случаях, как и во многих других, модель репрессорного действия соответствующего рибосомного белка аналогична таковой в случае репрессии цистрона *S* белком оболочки бактериофага MS2 или R17 (см. подразд. 15.4.1): RBS или по крайней мере его часть (инициаторный кодон или последовательность Шайна — Дальгарно) вовлечены в формирование достаточно лабильных вторичных и третичных структур, которые сами по себе не запрещают инициацию; однако, когда специфический белок-репрессор узнает эти структуры и связывается с ними, структуры становятся стабильными, что делает RBS недоступным для взаимодействий с рибосомой и с инициаторной тРНК. Таким образом, основная модель репрессорного действия рибосомных белков сводится к механизму *прямой конкуренции* белка-репрессора с иницирующей рибосомной частицей за связывание с районом RBS.

В то же время было показано, что в случае мРНК, кодирующей белки L10 и L7/L12 (см. рис. 15.7, шестая сверху), операторный район находится очень далеко по цепи в направлении к 5'-концу от RBS, в положении от -145 до -200, и не перекрывается ни с последовательностью Шайна — Дальгарно, ни с инициаторным кодоном. Здесь также легко заметить структурное сходство с рРНК (см. Драпер, 1989). Однако механизм репрессии в этом случае несколько иной: вместо прямого блокирования RBS, связывание репрессорного белка, по-видимому, индуцирует масштабные перестройки вторичной и третичной структур всего лидерного участка, что делает RBS недоступным для иницирующих рибосомных частиц.

Контроль белком S4 инициации трансляции полицистронной мРНК, начинающейся с цистрона S13 (см. рис. 15.7, четвертая сверху), происходит по еще более сложному механизму. Оператор включает в себя начало цистрона белка S13 и предшествующую ему последовательность мРНК длиной 75 нуклеотидов; он складывается в третичную структуру с двумя переплетенными псевдоузлами, но последовательность Шайна — Дальгарно и инициаторный кодон не вовлечены во вторичные и третичные взаимодействия (рис. 15.10). Соответственно псевдоузлы

которые приводят к задержке инициаторного комплекса на участке инициации (механизм *конформационной «ловушки»*), и прямой конкуренции между репрессором и рибосомной частицей не происходит.

На основании уже первых наблюдений такого рода была предложена модель координированной регуляции синтеза рибосомных белков (рис. 15.11; Номура и др., 1980, 1982). Эта модель основана на идее о конкуренции между мРНК и рибосомной РНК за связывание с «сердцевидными» рибосомными белками. Такие белки, как S4, S7, S8, L1, L4, а также комплекс L10•(L7/L12)₄, имеют сильное сродство к специфическим участкам связывания на рибосомных РНК. Поэтому после окончания их синтеза они немедленно вовлекаются в процесс сборки рибосомных частиц, напрямую связываясь с 16S и 23S рРНК. Собственное высокое сродство к рибосомной РНК и кооперативность сборки рибосомных частиц с участием других рибосомных белков приводят к вовлечению в процесс сборки всех появляющихся свободных рибосомных белков. В этих условиях мРНК не способны конкурировать за связывание с белками и, следовательно, могут транслироваться обычным путем. Однако, когда рибосомных белков становится больше, чем доступной рибосомной РНК, они остаются в свободном состоянии, что приводит к связыванию соответствующих ключевых белков со своими мРНК и, таким образом, ингибированию инициации трансляции. Строго последовательная трансляция полицистронных мРНК, кодирующих ряд рибосомных белков,

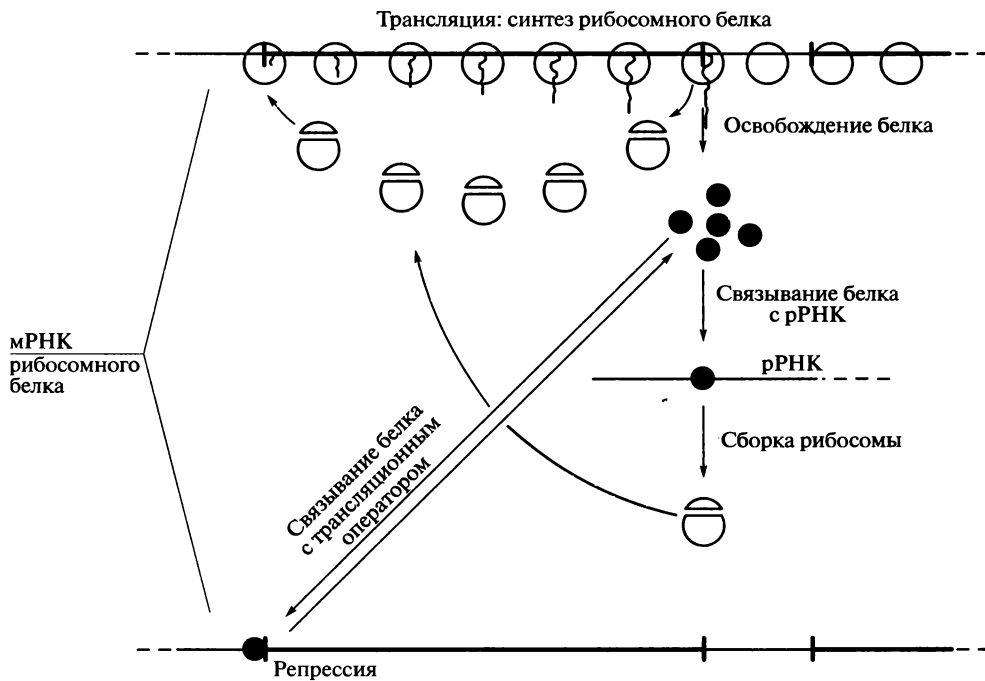


Рис. 15.11. Схема ауторегуляции (регуляции по принципу обратной связи) синтеза рибосомных белков.

Новосинтезированные рибосомные белки связываются с местами их локализации на рибосомной РНК — происходит сборка рибосомных частиц (правая часть схемы). Когда рибосомные белки оказываются в избытке, некоторые из них связываются с трансляционными операторами на их собственных полицистронных мРНК и репрессируют трансляцию (нижняя часть схемы)

делает возможным существование всего лишь одного репрессорного белка и одного участка его действия на каждую полицистронную мРНК для эффективной координированной репрессии трансляции всех белков, кодируемых данной полицистронной мРНК. Этот простой механизм обеспечивает прямую регуляторную связь между сборкой рибосом и синтезом рибосомных белков.

15.4.3. Трансляционная авторегуляция синтеза треонил-тРНК-синтетазы

Треонил-тРНК-синтетаза (Thr-APСаза) кодируется первым цистроном (*thrS*) полицистронной матрицы, содержащей также цистроны *infC*, кодирующий белок IF3; *rplT*, кодирующий рибосомный белок L20; *pheS* и *pheT*, кодирующие две субъединицы фенилаланил-тРНК-синтетазы; *himA*, кодирующий так называемый «хозяйский фактор интеграции». Было показано, что трансляция цистрона *thrS* репрессируется продуктом трансляции, Thr-APСазой. При избытке субстрата — деацилированной треониловой тРНК (тРНК^{Thr}) — репрессорное действие белка прекращается, и фермент продолжает синтезироваться. Следовательно, Thr-APСаза репрессирует трансляцию своей собственной мРНК и прекращает дальнейшую продукцию белка только в том случае, когда свободный фермент присутствует в клетке в избытке. Голодание по треонину, ведущее к накоплению деацилированной тРНК^{Thr}, приводит к прекращению репрессорного действия Thr-APСазы на *thrS* мРНК. При нормальных условиях роста немедленное вовлечение аминоацилированной тРНК^{Thr} в образование комплекса с EF-Tu•GTP позволяет свободной синтетазе репрессировать трансляцию *thrS* мРНК.

Было показано, что Thr-APСаза, существующая в виде гомодимера, связывается с участком *thrS* мРНК, расположенным со стороны 5'-конца от RBS. Этот участок мРНК образует стабильную шпильку в районе, непосредственно примыкающем к последовательности Шайна — Дальгарно (рис. 15.12). Шпилька оказалась структурой, связывающей фермент. Наиболее замечательное ее свойство заключается в том, что она имитирует структуру антикодонового стебля молекулы тРНК^{Thr}, в частности антикодоновой петли, включая антикодонподобный триплет CGU, которые и узнаются ферментом.

Рентгеноструктурный анализ комплексов основного операторного участка *thrS* мРНК с репрессором — Thr-APСазой (Морас и др., 2002) — и RBS *thrS* мРНК с иницирующей рибосомой (Юсупов и др., 2005) показал следующее. APСазарепрессор действительно связывается со шпилькой-оператором своим тРНК^{Thr}-узнающим С-концевым доменом, ответственным за специфическое узнавание антикодонподобной шпильки. При этом последовательность Шайна — Дальгарно и инициаторный кодон с 3'-стороны шпильки и одנותяжевой U-богатый участок с 5'-стороны шпильки, входящие в состав RBS, не закрываются репрессором. В отсутствие репрессора иницирующая рибосомная частица связывается с RBS, включая последовательность Шайна — Дальгарно и примыкающую к шпильке одנותяжевую U-богатую последовательность. Операторная шпилька не закрывается рибосомой; она оказывается на боковой лопасти («платформе») 30S субъединицы, будучи ориентированной приблизительно перпендикулярно двойной спирали SD-antiSD и в сторону от поверхности субъединицы. В целом *thrS* мРНК входит в межсубъединичный канал рибосомы между головкой и «плечом» малой субъединицы, проходит по «шее», огибая ее с внутренней (обращенной к боль-

шой субъединице) стороны и выходит в борозду между головкой и боковой лопастью («платформой») на противоположной стороне; спираль SD-antiSD фиксируется как раз между головкой и боковой лопастью, взаимодействуя с белками S11 и S18; основная операторная шпилька торчит в сторону. Если белок-репрессор (Thg-APСаза) прочно садится на эту операторную шпильку своим С-концевым доменом, то его массивный N-домен оказывается механической помехой для посадки рибосомной частицы на RBS, несмотря на его свободное от других взаимодействий состояние. Таким образом, в данном случае реализуется механизм *непрямой конкуренции* между репрессором и рибосомой.

15.5. «Рибопереключения»

Механизмы трансляционной репрессии предполагают участие мРНК-связывающих белков, которые своим связыванием с операторным участком мРНК подавляют инициацию ее трансляции. Дерепрессия наблюдается либо в результате взаимодействия белка-репрессора с низкомолекулярным эффектором, приводящим к потере белком его сродства к оператору мРНК, либо вследствие того, что белок-репрессор просто «пересаживается» на высокомолекулярный эффектор, которым часто является другая РНК. Однако у прокариотических организмов существуют и более примитивные — по-видимому, реликтовые, оставшиеся от древнего мира РНК, — механизмы подавления или активации трансляции непосредственно низкомолекулярными лигандами, без участия белков. Эти механизмы основаны на взаимодействии небелковых лигандов (метаболитов или кофакторов) со специфическими лигандузнающими структурами самой мРНК в районе RBS или его окрестностей. Так как синтетические короткие РНК, специфически узнающие низкомолекулярные лиганды, были названы *аптамерами* (см. подразд. 1.5.1), то для открытых позднее природных лигандузнающих структур в составе мРНК, ответственных за регуляцию трансляции этих мРНК, может быть предложено название *аптамерные операторы*. В современной научной литературе для их обозначения чаще используется менее удачный термин «рибопереключатели» (*riboswitches*).

В принципе механизм подавления инициации трансляции малым лигандом аналогичен трансляционной репрессии: метаболит или кофактор связывается со структурным доменом (*аптамерным модулем*) в 5'-нетранслируемой области мРНК, расположенной рядом с RBS или перекрывающейся с RBS, и его связывание индуцирует формирование или перестройку вторичной структуры, в результате чего RBS становится недоступным для иницирующих рибосомных частиц. Сам аптамерный модуль, как правило, не предсуществует в полном и стабильном виде в отсутствие метаболита. Достаивание соответствующей структуры и стабилизация трехмерного структурного модуля происходят в ответ на связывание метаболита. Таким образом, связывание метаболита индуцирует формирование трехмерного аптамерного модуля, в структуру которого прямо вовлекаются участки RBS, что и блокирует инициацию трансляции (рис. 15.13, *А*). Часто, однако, модуль, формирующийся с участием метаболита, прямо не вовлекает RBS в свою структуру, но включает участки мРНК из близлежащих структур, освобождая одноотяжевой участок, комплементарный RBS и блокирующий его (см. рис. 15.13, *Б*). Имеются и обратные примеры, когда в отсутствие метаболита инициация трансляции блокирована наличием шпильки, включающей

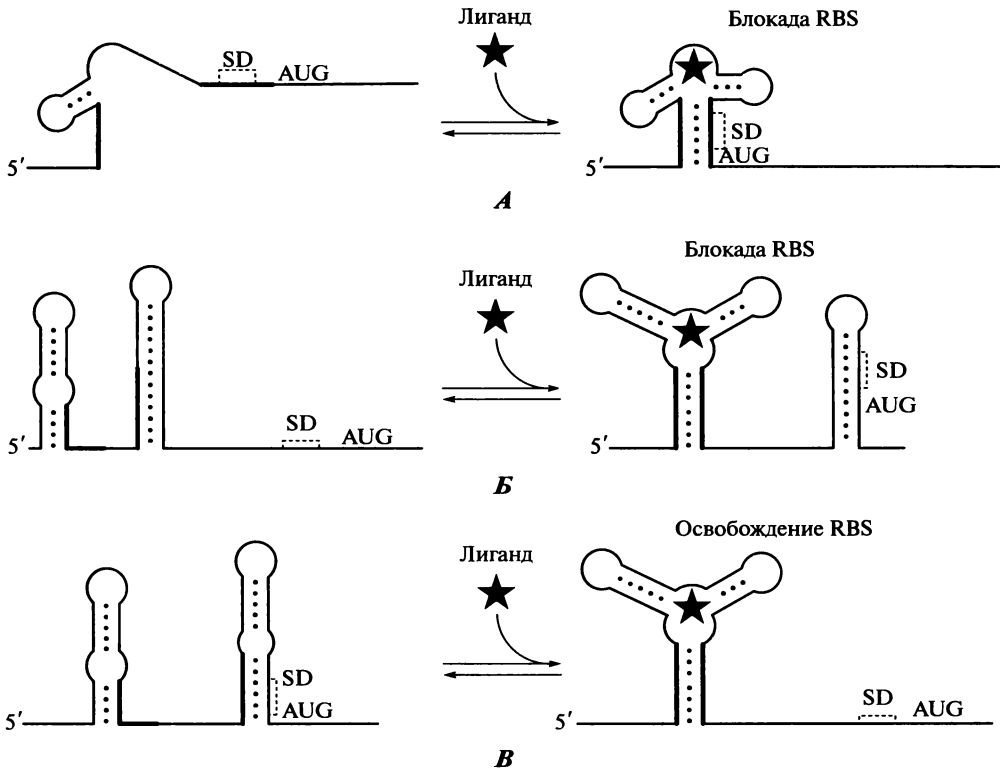


Рис. 15.13. Общая схема механизма выключения (*A*, *Б*) и включения (*В*) трансляции мРНК метаболитом.

A: метаболитиндуцированная стабилизация конформации, блокирующая рибосомосвязывающий участок мРНК (RBS).

Б: метаболитиндуцированная перестройка конформации, блокирующая рибосомосвязывающий участок мРНК (RBS).

В: метаболитиндуцированная перестройка конформации, освобождающая рибосомосвязывающий участок мРНК (RBS).

Жирными линиями показаны взаимно комплементарные последовательности, спаривающиеся при метаболитиндуцируемых перестройках. Пятиконечной звездочкой обозначен лиганд.

См. Nudler and Mironov (2003) *Trends Biochem. Sci.* **29**: 11–17. Tucker and Breaker (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 342–346

RBS, а связывание метаболита приводит к стабилизации аптамерного модуля, формирование которого приводит к разрушению шпильки и освобождению RBS (см. рис. 15.13, *В*).

Первыми изученными примерами такой регуляции были широко распространенные у бактерий механизмы подавления инициации трансляции мРНК, кодирующих ферменты синтеза витаминных кофакторов — тиамин (B_1), рибофлавина (B_2), кобаламина (B_{12}) — самими этими витаминами. В дальнейшем прямое связывание с 5'-нетранслируемой областью и подавление или активация трансляции метаболитами было показано для мРНК, кодирующих ферменты синтеза и транспортные белки некоторых аминокислот, пуриновых нуклеотидов и других метаболитов. Природные аптамерные модули в большинстве случаев оказываются значительно крупнее (70—170 нуклеотидных остатков) и сложнее по своим вторичной и третичной структурам, чем синтетические аптамеры, что, очевидно,

обеспечивает их бóльшую избирательность и бóльшее сродство к лигандам, а также участие в регуляционных процессах, а не просто в связывании лигандов. На рис. 15.14 представлена схема регуляции (подавления) трансляции мРНК, кодирующих разнообразными ферментами различных стадий синтеза тиамин, но во всех случаях содержащих похожие нуклеотидные последовательности на 5'-концах (*thi-box*) и соответственно сворачивающихся почти идентичным образом в сложную вторичную структуру. Две изображенные структуры находятся в равновесии, со сдвигом влево, где последовательность Шайна—Дальгарно (SD) открыта для взаимодействия с иницирующей рибосомной частицей и, следовательно, транс-

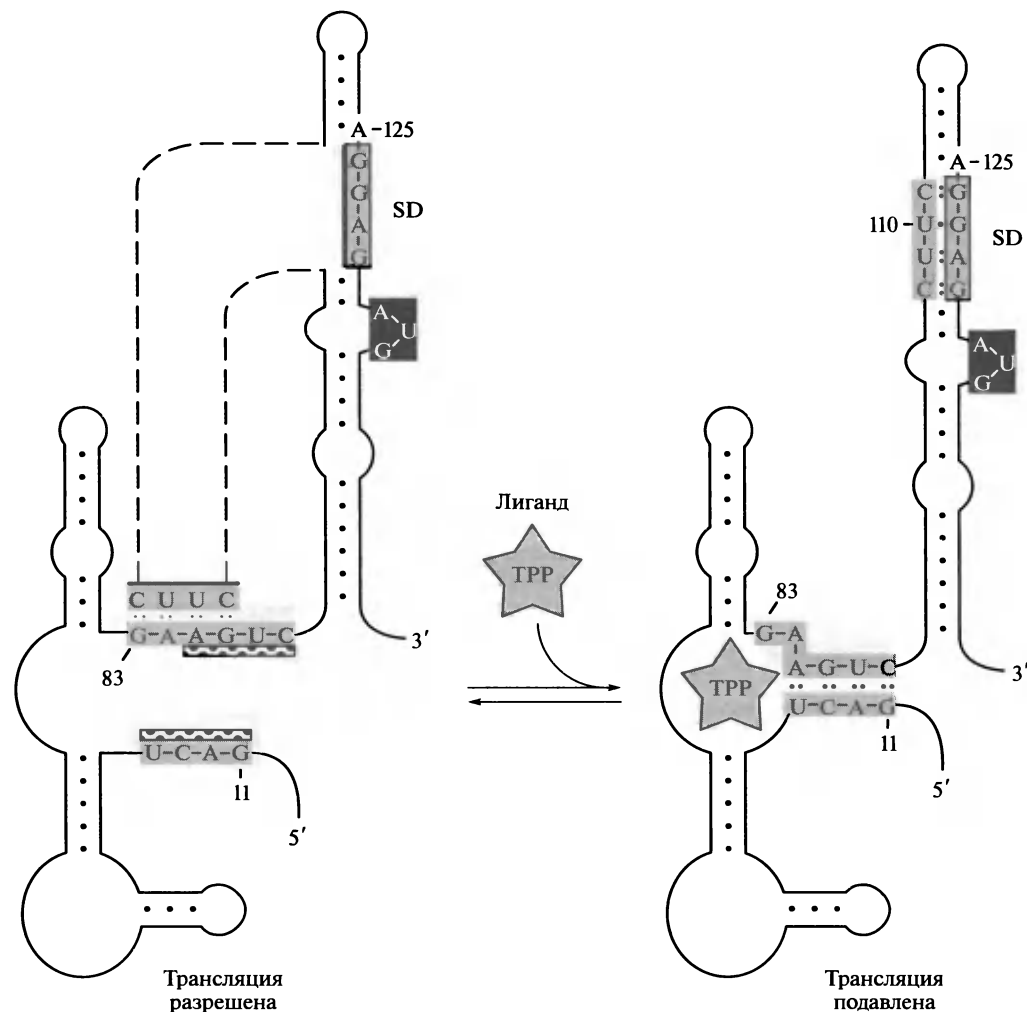


Рис. 15.14. Схема выключения трансляции семейства мРНК, кодирующих ферменты биосинтеза тиамин, продуктом биосинтеза тиаминпирофосфатом (TPP) путем перестройки аптамерного модуля 5'-проксимальной области мРНК.

Взаимно комплементарные последовательности отмечены серым фоном, инициаторный кодон — черным фоном, SD-последовательность заключена в рамку. Пятиконечной звездочкой обозначен лиганд — в данном случае тиаминпирофосфат.

Winkler et al. (2002) *Nature* 419: 952—956

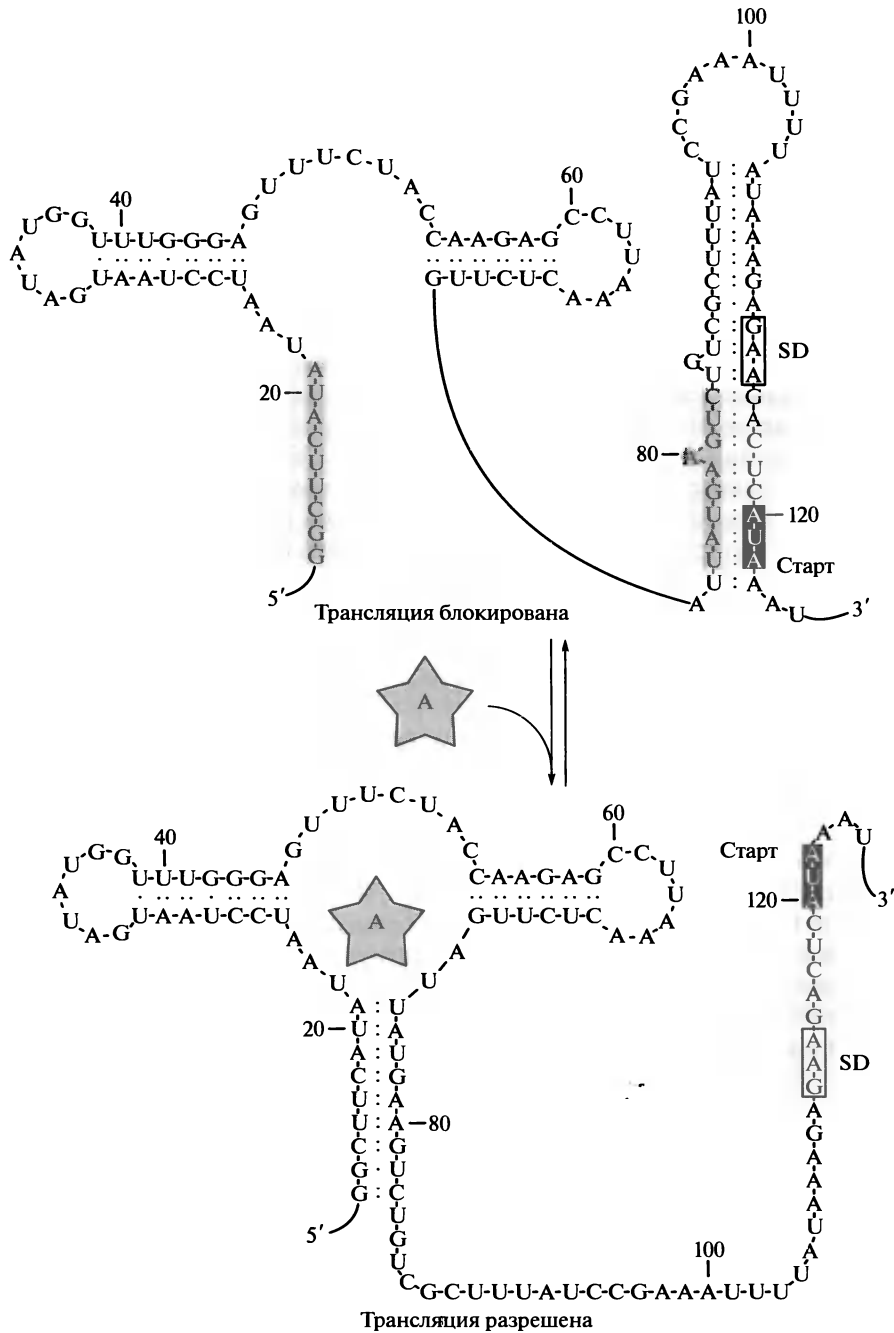


Рис. 15.15. Схема регуляции трансляции семейства мРНК, кодирующих ферменты синтеза нуклеотидов, аденинсвязывающим аптамерным модулем 5'-проксимальной области мРНК. Взаимно комплементарные последовательности на верхней структуре отмечены серыми линиями, инициаторный кодон — черным фоном, SD-последовательность заключена в рамку. Пятиконечной звездочкой обозначен лиганд — в данном случае аденин (A).

Serganov et al. (2004) *Chem. Biol.* **11**: 1729—1741

ляция разрежена. Присутствие тиаминпирофосфата (ТРП) приводит к сдвигу равновесия вправо: связывание лиганда с аптамерным модулем стабилизирует замкнутую конформацию, при которой последовательность, ранее спаренная с «анти-SD», взаимодействует с 5'-концевым участком, и освободившаяся «анти-SD» спаривается с SD, блокируя инициацию трансляции. Аналогичным образом происходит и ингибирование инициации трансляции в результате связывания 5'-концевых аптамерных модулей мРНК, кодирующих ферменты синтеза и транспортные белки рибофлавина, кобаламина, метионина, лизина, соответственно с флавиномононуклеотидом, аденозилкобаламином, S-аденозилметионином, лизином (см. обзоры: Vitreschak, A. G., et al., 2004; Mandal, M., and Breaker, R. R., 2004).

Эффект активации трансляции при связывании аптамерного модуля с метаболитом можно наблюдать в случае трансляционной регуляции пуринового метаболизма. На рис. 15.15 приведена схема регуляции трансляции аденинсвязывающим аптамерным модулем. В отсутствие аденина как последовательность Шайна—Дальгарно, так и инициаторный кодон AUG находятся в составе длинной шпильки и закрыты от взаимодействия с рибосомной частицей. Связывание аденина с уридиловым остатком (U74) на стыке двух шпилек стабилизирует альтернативную структуру с замкнутым А-связывающим карманом, в результате чего участок цепи 75—83 оказывается спаренным с 5'-концевым участком мРНК, а прежняя длинная шпилька дестабилизируется и исчезает, освобождая RBS для связывания с рибосомной частицей.

Важно подчеркнуть, что специфические последовательности (*thi*, *RNF*, *B12*, *S-box*, *G-box*, *L-box* и т. д.) в 5'-нетранслируемых областях соответствующих мРНК, формирующие аптамерные модули для связывания, соответственно тиаминпирофосфата, флавиномононуклеотида, аденозилкобаламина, S-аденозилметионина, пуринов, лизина и других метаболитов, поразительно консервативны не только среди мРНК, кодирующих разные белки данной области метаболизма, но и в эволюционном смысле. Они присутствуют в почти неизменном виде у бактерий самых разных видов, принадлежащих к таксономически самым удаленным группам. Это безусловно свидетельствует о древности рассматриваемого механизма регуляции трансляции, возможно происходящего непосредственно из первобытного мира РНК.

Интересно, что самые примитивные способы «рибопереключений» могут быть основаны просто на физических свойствах РНК и осуществляться без участия

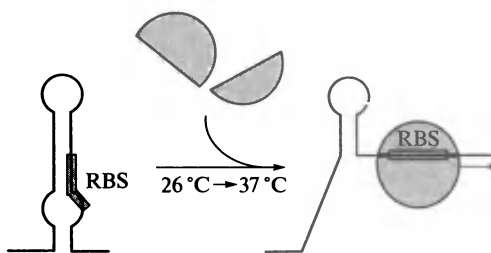


Рис. 15.16. Термосенсорный модуль в районе рибосомсвязывающего участка (RBS) мРНК, кодирующей бактериальные факторы вирулентности (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis*). При пониженной температуре RBS недоступен рибосомам, так как включен в стабильную шпильку, и, следовательно, мРНК не транслируется. Повышенная температура частично расплавляет шпильку, открывая RBS и тем самым разрешая трансляцию.

Johansson et al. (2002) *Cell* **110**: 551—561

лигандов. Яркий пример «рибопереключателй» такого типа — термосенсорные модули в районах RBS мРНК, кодирующих факторы вирулентности некоторых патогенных бактерий, например возбудителя чумы *Yersinia pestis* и возбудителя листериоза *Listeria monocytogenes*. RBS этих мРНК «спрятаны» во вторичной структуре, плавящейся при +37 °С. Соответственно эти мРНК транслируются только при попадании бактерий в теплокровный организм, но закрыты и «молчат» в любой другой среде при более низкой температуре (рис. 15.16).

15.6. Антисмысловое блокирование

Еще более примитивным и, по-видимому, тоже реликтовым механизмом регуляции трансляции, иногда (хотя и редко) наблюдаемым у прокариот, является прямое использование молекул РНК, комплементарных участкам мРНК. Действительно, участки связывания рибосом (RBS) на мРНК могут быть заблокированы путем взаимодействия с комплементарными РНК, называемыми в этих случаях *антисмысловыми РНК*. У бактерий известно несколько случаев такого

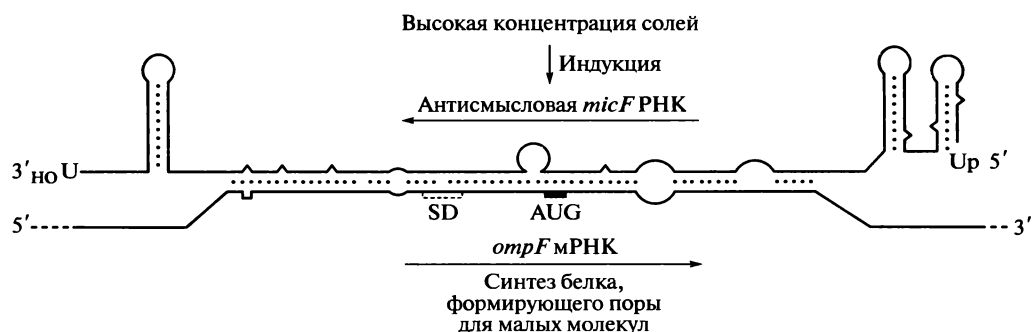


Рис. 15.17. Схема комплементарного взаимодействия между 5'-проксимальным районом *ompF* мРНК, кодирующей белок внешней мембраны *Escherichia coli* (нижняя линия, обозначен указанный район мРНК, включающий RBS), и антисмысловой *micF* РНК (верхняя линия).

RBS *ompF* мРНК отмечен инициаторным кодоном AUG и предшествующей последовательностью SD.

Mizuno et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1966—1970

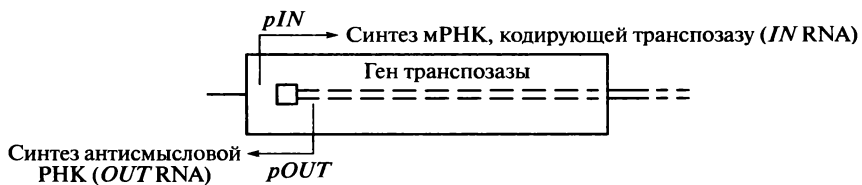


Рис. 15.18. Схема транскрипции гена транспозазы, кодируемой вставкой *IS10* транспозона *Tn10*.

Транскрипция происходит в двух противоположных направлениях с использованием промоторов *pIN* и *pOUT*, приводя к образованию антисмысловой РНК (*OUT* РНК), которая полностью комплементарна району RBS смысловой мРНК, кодирующей транспозазу (*IN* РНК).

Simons and Kleckner (1983) *Cell* **34**: 683—691

блокирования RBS природными антисмысловыми РНК. Интересно, что транскрипты дополнительных генетических элементов, таких как плазмиды, транспозоны, а также бактериофаги, контролируются антисмысловыми РНК чаще, чем геномные мРНК. Возможно, это связано с реликтовой природой такого способа регуляции.

Наиболее известный пример антисмысловой РНК, контролирующей трансляцию геномной РНК у *E. coli*, — так называемая *micF* РНК (Иноуэ и др., 1984; Мицushima и др., 1987). Эта РНК регулирует синтез OmpF, белка внешней бактериальной мембраны, формирующего диффузионные поры для небольших молекул. Существуют два подвида этой РНК, длиной 93 и 174 нуклеотида. Оба подвида транскрибируются со специального хромосомного участка, удаленного от гена *ompF*; их транскрипция индуцируется повышенным осмотическим давлением среды. Эта РНК частично комплементарна RBS *ompF* мРНК, включая последовательность Шайна — Дальгарно и инициаторный кодон (рис. 15.17). Продукция *micF*-РНК, индуцированная высоким осмотическим давлением, приводит к ее комплементарному взаимодействию с *ompF* мРНК в районе RBS, которое блокирует инициацию трансляции *ompF* мРНК. Таким образом в данных условиях происходит ингибирование синтеза белка OmpF в бактериальных клетках.

Синтез транспозазы, закодированной в последовательности *IS10* транспозона *Th10*, контролируется антисмысловой РНК *OUT* (длиной 70 нуклеотидов) (Ма и Симонс, 1990). Однако в данном случае антисмысловая РНК транскрибируется с района RBS самого гена транспозазы, но в направлении, противоположном направлению транскрипции мРНК транспозазы (рис. 15.18, промоторы *pIN* и *pOUT*). Следовательно, *OUT* мРНК полностью комплементарна участку мРНК транспозазы (*IN* РНК), содержащему RBS, и, таким образом, блокирует связывание рибосом и инициацию трансляции на этой мРНК. Для некоторых мРНК бактериофагов и плазмид были описаны похожие способы регуляции их трансляции с помощью антисмысловых РНК, транскрибируемых с регулируемых генов в противоположном направлении.

Существуют также и редкие примеры активации трансляции с помощью комплементарной («антисмысловой») РНК. Так, у *Escherichia coli* в нормальных условиях трансляция мРНК, кодирующей белок холодового шока RpoS, ингибирована из-за вовлечения RBS этой мРНК в стабильную шпильчатую структуру. При низких температурах в клетках индуцируется синтез малой РНК — так называемой *DsrA* sRNA, которая частично комплементарна 5'-проксимальной цепи шпильки; образование двуспирального дуплекса между ними освобождает RBS мРНК и, таким образом, разрешает инициацию ее трансляции (Репойла и др., 2003) (рис. 15.19).

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 15

- Aiba, H., Matsuyama, S.-I., Mizumo, T., and Mizushima, S. (1987). Function of *micF* as an antisense RNA in osmoregulatory expression of the *ompF* gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 3007—3012.
- De Smit, M. H. & van Duin, J. (1990). Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **38**: 1—35.
- Jenner, L., Romby, P., Rees, B., Schulze-Briese, C., Springer, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Moras, D., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2005). Translational operator of mRNA on the ribosome: How repressor proteins exclude ribosome binding. *Science* **308**: 120—123.
- Ma, C., and Simons, R. W. (1990). The *IS10* antisense RNA blocks ribosome binding at

- complexes. *Acta Cryst., sect. D*, **62**: 1545—1554.
- Merianos, H. J., Wang, J., and Moore, P. B. (2004). The structure of a ribosomal protein S8/*spc* operon mRNA complex. *RNA* **10**: 954—964.
- Mizuno, T., Chou, M.-Y., and Inouye, M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1966—1970.
- Moine, H., Romby, P., Springer, M., Grunberg—Manago, M., Ebel, J.-P., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1990). *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase and tRNA^{Thr} modulate the binding of the ribosome to the translational initiation site of the *ThrS* mRNA. *J. Mol. Biol.* **216**: 299—310.
- Nevskaya, N., Tishchenko, S., Gabdoulkhalov, A., Nikonova, E., Nikonov, O., Nikulin, A., Platonova, O., Garber, M., Nikonov, S., and Piendl, W. (2005). Ribosomal protein L1 recognizes the same specific structural motif in its target sites on the autoregulatory mRNA and 23S rRNA. *Nucl. Acids Res.* **33**: 478—485.
- Nomura, M., Yates, J. L., Dean, D., and Post, L. E. (1980). Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: Structural homology of ribosomal RNA and ribosomal protein mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7084—7088.
- Repoila, F., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003). Small non-coding RNAs, coordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.* **48**: 855—861.
- Sarabhai, A., and Brenner, S. (1967). A mutant which reinitiates the polypeptide chain after chain termination. *J. Mol. Biol.* **27**: 145—162.
- Simons, R. W., and Kleckner, N. (1983). Translational control of *IS10* transposon. *Cell* **34**: 683—691.
- Tishchenko, S., Nikonova, E., Nikulin, A., Nevskaya, N., Volchkov, S., Piendl, W., Garber, M., and Nikonov, S. (2006). Structure of ribosomal protein L1-mRNA complex at 2.1 Å resolution: common features of crystal packing of L1-RNA complexes. *Acta Cryst., sect. D*, **62**: 1545—1554.
- Torres-Larios, A., Dock-Bregeon, A.-C., Romby, P., Rees, B., Sankaranarayanan, R., Caillet, J., Springer, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Moras, D. (2002). Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl tRNA synthetase. *Nature Struct. Biol.* **9**: 343—347.

Сборники и обзоры

- Высоцкая, В. С., и Гарбер, М. Б. (1995). Регуляция экспрессии генов рибосомных белков *Escherichia coli*. *Успехи биологической химии* **35**: 67—95.
- Четверин, А. Б. (1998). Бактериофаг Q β как объект молекулярной биологии. *Успехи биологической химии* **38**: 3—75.
- Draper, D. E. (1989). How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autogenously regulated ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 335—338.
- Gold, L. (1988). Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 199—233.
- Gualerzi, C., la Teana, A., Spurio, R., Canonaco, M. A., Severini, M., and Pon, C. L. (1990). Initiation of protein biosynthesis in prokaryotes: Recognition of mRNA by ribosomes and molecular basis for the function of initiation factors. In *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution* (eds. Hill, W. E., Dahlberg, A., Garrett, R. A., Moore, P. B., Schlessinger, D., and Warner, J. R.), pp. 281—291. ASM Press, Washington, D. C.
- Lindahl, L., and Zengel, J. M. (1986). Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* **20**: 297—326.
- Malmgren, C., Engdahl, H. M., Romby, P., and Wagner, E. G. H. (1996). An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: The case of plasmid R1. *RNA* **2**: 1022—1032.
- Mandal, M., and Breaker, R. R. (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**: 451—463.
- McCarthy, J. E. G., and Brimacombe, R. (1994). Prokaryotic translation: the interac-

- tive pathway leading to initiation. *Trends Genet.* **10**: 402—407.
- McCarthy, J. E. G., and Gualerzi, C. (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* **6**: 78—85.
- Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 75—117.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., and Gelfand, M. S. (2004). Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet.* **20**: 44—50.
- Voorma, H. O. (1996). Control of translation initiation in prokaryotes. In *Translational Control* (eds. Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., and Sonenberg, N.), pp. 759—777. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Weissmann, C., Billeter, M. A., Goodman, H. M., Hindley, J., and Weber, H. (1973). Structure and function of phage RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **42**: 303—328.

16.1. Значение регуляции трансляции у эукариот

Продукция белков в эукариотических клетках может регулироваться на нескольких уровнях, перечисленных ниже:

- 1) выдача закодированной в геноме информации в форме РНК, т.е. уровень транскрипции;
- 2) посттранскрипционная «перекройка» («процессинг») РНК и ее транспорт из ядра в цитоплазму;
- 3) считывание мРНК рибосомами, т.е. уровень трансляции;
- 4) деградация продукта трансляции;
- 5) деградация мРНК.

Рибосомы могут быть вовлечены в некоторые из указанных уровней, например контроль деградации мРНК, но трансляционная регуляция продукции белка является главным среди всех тех способов, которые непосредственно связаны с рибосомами.

Относительная метаболическая стабильность большинства эукариотических мРНК делает трансляционный контроль особенно важным в общей системе регуляции синтеза белка у эукариот.

Наряду с сигналами активации мРНК (т.е. инициации трансляции) важны и сигналы остановки трансляции. Гормональная регуляция трансляции представляет собой пример как включения, так и выключения трансляции определенных мРНК.

Другой пример — тепловой шок, который инициирует трансляцию небольшого количества специальных белков, в то время как трансляция большинства уже существующих мРНК останавливается или замедляется; возвращение к нормальной температуре сопровождается восстановлением трансляции большинства мРНК и остановкой или замедлением синтеза белков теплового шока.

Далее, оогенез и сперматогенез, так же как и созревание семян растений, приводят к инаktivации и накоплению мРНК, которые затем существуют в ооцитах, сперматоцитах или семенах в нетранслируемой — маскированной — форме.

Оплодотворение, так же как и прорастание семян, сопровождается общей и селективной активацией трансляции маскированных мРНК. В процессах эмбрионального развития и клеточной дифференцировки синтез мРНК и их накопление в цитоплазме могут происходить задолго до того, как эти мРНК начинают использоваться для трансляции; специфические сигналы избирательно активируют соответствующие мРНК на нужных стадиях.

Известно несколько систем трансляционной регуляции у эукариот. Они могут быть подразделены на две группы: системы тотальной регуляции общего уровня трансляции в клетке и системы специфического (избирательного по отношению к разным мРНК) контроля трансляции.

16.2. Тотальная регуляция трансляции путем модификации факторов инициации

16.2.1. Фосфорилирование eIF2

Фосфорилирование eIF2, Met-tRNA•GTP-связывающего фактора инициации, а именно его α -субъединицы, является основным механизмом тотальной регуляции трансляции в клетках животных и грибов. Это фосфорилирование приводит к подавлению инициации трансляции молекул мРНК эукариотической клетки в ответ на голодание, недостаток ростовых факторов, дефицит железа, стресс, включая тепловой шок, вирусную инфекцию и другие неблагоприятные воздействия. Фосфорилирование может осуществляться несколькими специфическими фосфокиназами, образующими особое семейство eIF2-киназ. Все они атакуют остаток серина в N-концевой части α -субъединицы eIF2 (Ser51). Более или менее изучены четыре такие киназы. Одна из них носит название «гем-контролируемый репрессор» (HCR, *Heme-Controlled Repressor*), или «гем-регулируемый ингибитор» (HRI, *Heme-Regulated Inhibitor*). Это белок с молекулярной массой мономера около 90 кДа (625 аминокислотных остатков), представленный в растворимой (не связанной с рибосомами) димерной форме. Киназная активность индуцируется в ретикулоцитах и цитоплазме ряда других клеток млекопитающих недостатком гема или железа, а также некоторыми иными воздействиями. Данная киназа найдена также у других позвоночных животных и в грибах. Вторая изученная киназа, называемая ингибитором, активируемым двуцепочечной РНК (DAI, *Double-stranded RNA-Activated Inhibitor*), или рибосомной протеинкиназой (PKR, *Protein Kinase of Ribosomes*), имеет в мономерной форме молекулярную массу 68 кДа (550 аминокислотных остатков) и ассоциирована с рибосомами. Ее синтез в клетках млекопитающих индуцируется интерфероном. Обнаруживается она и в клетках других позвоночных. Третий тип фосфокиназ, атакующих Ser51 α -субъединицы eIF2, был сначала открыт у дрожжей и обозначен по названию соответствующего дрожжевого гена — GCN2; затем оказалось, что он типичен также для клеток млекопитающих и, возможно, даже для всех эукариот. Эта киназа — самая крупная из известных eIF2-киназ и представляет собой многодоменный белок молекулярной массой мономерной полипептидной цепи около 180 кДа (примерно 1500 аминокислотных остатков); обнаруживается всегда в форме димера. Она активируется в ответ на голодание клетки, а более конкретно — на недостаток аминокислот. Важную роль в тотальной регуляции трансляции у млекопитающих и, по-видимому, других позвоночных и беспозвоночных животных играет нерастворимая eIF2-киназа PERK («PKR-like ER Kinase»), связанная с мембраной эндоплазматического ретикулума (ER) и активируемая при некоторых стрессовых воздействиях на клетку (ER stress). Это тоже крупный многодоменный белок; его молекулярная масса в мономерной форме составляет около 140 кДа (1100 аминокислотных остатков). Киназные домены перечисленных eIF2-киназ обнаруживают значительную гомологию своих первичных и пространственных структур. В целом все четыре киназы либо представляют собой постоянные гомодимеры, либо димеризуются при активации (хотя для киназы HCR были предложены модели ее активации как в форме димера, так и с сопутствующей диссоциацией на активные мономеры). Активация eIF2-киназ всегда сопровож-

дается множественным фосфорилированием и автофосфорилированием самого фермента по сериновым и треониновым остаткам.

Следует отметить, что и в условиях отсутствия активирующих воздействий некоторый уровень eIF2-киназной активности, по-видимому, всегда имеет место в нормальных клетках. Однако наряду с киназами в клетках присутствуют активные фосфатазы, возвращающие фосфорилированный eIF2 в исходное нефосфорилированное состояние.

Механизм ингибирования белкового синтеза в результате фосфорилирования eIF2 оказался непростым. Было обнаружено, что eIF2 с фосфорилированной α -субъединицей способен формировать тройственный комплекс Met-tRNA•GTP•eIF2, который взаимодействует с рибосомными частицами, и в дальнейшем ходе инициации происходит нормальный гидролиз ГТФ с освобождением eIF2 и ГДФ. Однако, когда комплекс фосфорилированного eIF2 с ГДФ (eIF2 α P•GDP) выходит из рибосомы и взаимодействует с eIF2B (см. гл. 14, рис. 14.13), формируется стабильный комплекс eIF2 α P•eIF2B. Таким образом eIF2B, присутствующий в клетке в ограниченных количествах, оказывается связанным в комплекс с белком eIF2 α P (рис. 16.1). В условиях нехватки свободного eIF2B обмен ГТФ/ГДФ на eIF2 происходит медленно и скорость инициации понижается. Другими словами, имеет место негативная регуляция повторного использования eIF2. Следовательно, клетки млекопитающих реагируют на недостаток гема, аминокислотное голодание, стресс, вирусные инфекции и некоторые другие воздействия уменьшением общего уровня синтеза белка по описанному выше механизму ингибирования инициации.

Ингибирование синтеза белка в ретикулоцитах в ответ на недостаток гема или железа является первым и наиболее хорошо изученным случаем тотальной регу-

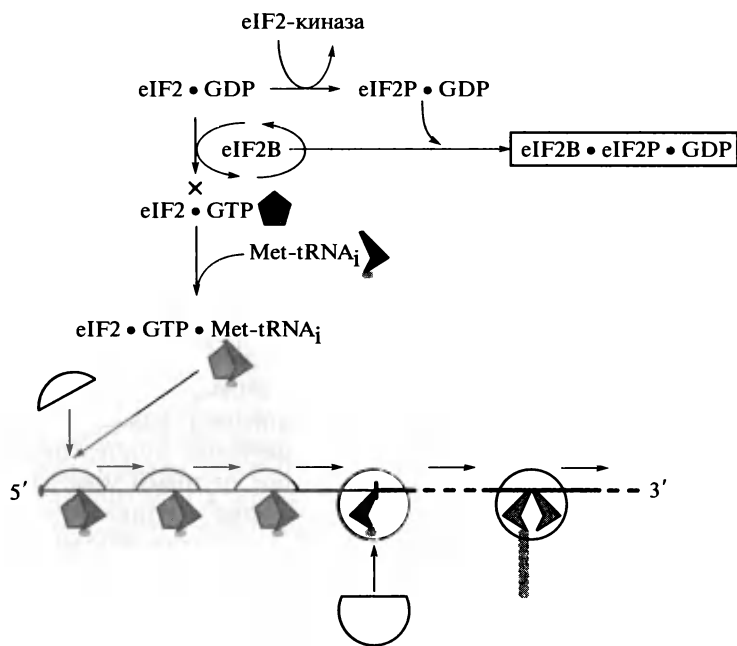


Рис. 16.1. Схема механизма тотального подавления инициации трансляции eIF2-киназами

ляции трансляции по этому механизму. Латентная киназа HCR несет на себе связанный гем и формирует неактивный гомодимер с участием дисульфидных мостиков. Уменьшение уровня гема в результате дефицита железа в клетке ведет к диссоциации связанного гема, которая индуцирует восстановление внутримолекулярных дисульфидных мостиков в латентном HCR и его множественное фосфорилирование и автофосфорилирование, что обуславливает его активацию. Фосфорилированная активная киназа атакует eIF2.

Другой изученный пример глобальной регуляции трансляции — ингибирование тотального синтеза белка киназами, активируемыми двуцепочечными РНК (киназа DAI, или PKR) при вирусных инфекциях. Прежде всего, многие вирусы индуцируют в клетках млекопитающих продукцию интерферона, который, в свою очередь, стимулирует синтез этой киназы и переход клетки в так называемое «антивирусное состояние». Так же как и HCR, киназа PKR не активна до тех пор, пока не фосфорилирована. В отличие от HCR неактивная PKR существует в форме мономера. Ее N-концевая часть содержит два РНК-связывающих домена, специфически взаимодействующих с двуспиральной РНК. Проникновение вирусов в клетку, содержащую такую киназу, т.е. появление в клетке длинных двуцепочечных участков вирусной РНК, активирует синтезированную PKR путем прямого взаимодействия двуцепочечного участка или его фрагмента с киназой. Когда мономерные молекулы PKR связываются с двуспиральной РНК, они взаимодействуют между собой, что приводит к их димеризации и взаимному фосфорилированию или автофосфорилированию. Активация киназы ведет к фосфорилированию eIF2 и, как следствие, к уменьшению скорости инициации. Данный процесс среди других процессов, индуцируемых интерфероном, может играть значительную роль в ингибировании синтеза вирусных компонентов.

Фосфорилирование eIF2, будучи регуляторным ответом клетки на вирусную инфекцию (негативная регуляция тотального синтеза белка), может, в свою очередь, регулироваться вирусом (негативная регуляция фосфорилирования). Действительно, многие вирусы кодируют или индуцируют фактор, препятствующий фосфорилированию eIF2. Например, аденовирусы синтезируют небольшие транскрипты, называемые РНК VA (I или II), которые могут связываться с латентной PKR и блокировать ее активацию. Вирус Эпштейна—Барр также продуцирует небольшие РНК (EBER-1 и EBER-2), которые связываются с киназой и блокируют ее активацию. Полиовирусы на ранних стадиях инфекции индуцируют протеолитическую дегградацию киназы. Вирус гриппа стимулирует продукцию клеточного (не закодированного в геноме вируса) белка p58, оказывающего на киназу сильный ингибиторный эффект. Все это позволяет обойти защитную негативную регуляцию, обеспечиваемую хозяйской клеткой, и восстановить высокий общий уровень синтеза белка, необходимый вирусу для масштабной продукции вирусных компонентов.

Киназа GCN2 характеризуется тем, что она содержит структурный домен, гомологичный гистидиновой аминацил-тРНК-синтетазе (HisRS). При голодании вследствие отсутствия свободного гистидина в клетке накапливается деацилированная тРНК^{His}, которая связывается с доменом HisRS рассматриваемой eIF2-киназы. Связывание тРНК индуцирует перестройку димера фермента и его автофосфорилирование, что приводит к активации фермента — узнаванию eIF2 в качестве субстрата и его специфическому фосфорилированию по сериновому остатку (Ser51) α -субъединицы.

Мембранно-связанная киназа PERK встроена в мембрану эндоплазматического ретикулаума так, что ее С-концевой киназный домен обращен в цитоплазму, а N-концевой сигнальный домен — в просвет (люмен) эндоплазматического ретикулаума; между этими концевыми доменами расположен трансмембранный домен. Как и PKR, киназа PERK в неактивном виде представлена, по-видимому, мономерными молекулами, а их сигнальные домены связаны с молекулами люминальных шаперонов BiP. Когда в ответ на стресс в просвете появляются развернутые (денатурированные) белки, они связывают BiP, освобождая сигнальные домены, что приводит к их димеризации и даже олигомеризации. В результате этого происходит индукция автофосфорилирования киназных доменов в цитоплазме и соответственно активация киназы.

16.2.2. Фосфорилирование eIF4E и 4E-ВР

Известно, что большинство эукариотических факторов инициации, особенно в клетках млекопитающих, подвержены фосфорилированию. Это относится к ряду субъединиц белков eIF2B, eIF3 и eIF4F, а также к мономерным белкам eIF4B и eIF5. Фосфорилирование может осуществляться различными неспецифическими протеинкиназами, такими как протеинкиназа С, казеинкиназы, киназа рибосомного белка S6, цАМФ-зависимая киназа и т.д. Однако функциональное значение такого фосфорилирования не совсем ясно. Вышеперечисленные белки активны как в фосфорилированном, так и в нефосфорилированном состоянии, хотя существуют указания на взаимосвязь между увеличением степени их фосфорилирования и усилением синтеза белка. Для кэп-связывающих факторов eIF4F и его субъединицы eIF4E было показано, что их фосфорилирование или абсолютно необходимо для активности (фосфорилирование Ser53 в eIF4E), или оказывает сильный стимулирующий эффект (фосфорилирование субъединицы eIF4G в составе фактора eIF4F). Такое фосфорилирование, и в особенности фосфорилирование eIF4E по остатку Ser53, может регулировать общую скорость инициации эукариотической трансляции. Дело в том, что eIF4E, будучи кэп-связывающей субъединицей eIF4F, является одним из лимитирующих компонентов аппарата инициации, и поэтому количество активной субъединицы определяет количество полноразмерного функционального eIF4F, ответственного за кэп-зависимую инициацию.

В то же время основную роль в контроле уровня eIF4E в клетке играет, по-видимому, фосфорилирование не самого фактора, а специального eIF4E-связывающего белка (4E-ВР). Белок 4E-ВР образует с eIF4E неактивный комплекс, удаляя свободный активный фактор из среды. Показано, что множественное фосфорилирование белка 4E-ВР митогензависимой киназой (MAP), индуцируемой инсулином или факторами роста, приводит к диссоциации комплекса и освобождению активного eIF4E. Увеличение доступного количества лимитирующего фактора инициации (eIF4E и, следовательно, eIF4F) не просто повышает общий уровень инициации трансляции в клетке, но и приводит к качественному сдвигу в профиле трансляции разных мРНК: в этих условиях начинают в значительной мере транслироваться «слабые» мРНК (к ним относятся мРНК многих цитокинов и факторов роста), для трансляции которых ранее не хватало лимитирующих факторов инициации (см. подразд. 16.3.3). Таким образом, тотальная регуляция количества активного eIF4E путем фосфорилиро-

вания 4E-ВР играет важную роль в контроле клеточного роста и пролиферации.

Следует отметить, что через воздействие на eIF4E может осуществляться также и мРНК-специфическая регуляция инициации трансляции. Так, один из наиболее распространенных способов специфического «выключения» определенных мРНК в цитоплазме в процессе эмбриогенеза — ингибирование их инициации трансляции путем блокирования кэп-связывающего белка eIF4E при посредстве «маскирующего элемента» их 3'-НТО и связывающегося с ним первичного маскирующего белка. При исследовании процессов эмбриогенеза у лягушки (*Xenopus*) как представителя позвоночных и у мухи (*Drosophila*) как беспозвоночного животного (см. подразд. 16.6) оказалось, что за связыванием первичного маскирующего белка с 3'-НТО обычно следует присоединение к этому комплексу еще одного белка, обозначаемого Maskin в случае *Xenopus* или Cup в случае дрозофилы. Будучи привязанными к 3'-НТО мРНК, Maskin (или Cup) являются eIF4E-связывающими белками. Таким образом, Maskin (или Cup), локализованный на 3'-НТО мРНК, взаимодействует с кэп-связыванным eIF4E данной мРНК и препятствует сборке инициаторного комплекса на 5'-конце (см. далее рис. 16.9). Это и есть наблюдаемое специфическое «выключение» определенных мРНК, которое может инициировать либо их последующее маскирование с участием еще ряда мРНК-связывающих белков, включая РНП-образующий белок УВ (см. подразд. 16.6), либо деградацию.

16.3. Дискриминация мРНК иницирующими рибосомными частицами и факторами инициации

Разные эукариотические мРНК, так же как и прокариотические мРНК, имеют различную «силу» инициации трансляции; другими словами, инициация на них происходит с различными скоростями. Этот параметр в основном определяется структурами мРНК и в первую очередь структурами их 5'-концевых участков и районов около инициаторного кодона. Решающую роль могут играть два обстоятельства: во-первых, доступность этих структур мРНК и их сродство непосредственно к малой рибосомной субъединице и, во-вторых, сродство этих структур к лимитирующему РНК-связывающему фактору инициации — в первую очередь к eIF4F.

16.3.1. Дискриминация мРНК через сродство к рибосомной частице

Как упоминалось в подразд. 15.2, явление дискриминации мРНК иницирующими рибосомными частицами типично для прокариот. У эукариот в ряде случаев также можно наблюдать дискриминацию мРНК за счет различного сродства 5'-концевых и инициаторных участков мРНК к 40S рибосомным субъединицам. Классический пример использования, по-видимому, этого пути трансляционной дискриминации — различные скорости трансляции мРНК, кодирующих α - и β -глобиновые цепи в ретикулоцитах млекопитающих. Было показано, что мРНК β -глобина транслируется более эффективно, чем мРНК α -глобина. В то же время скорость элонгации на обеих матрицах оказалась одинаковой. Доказано, что именно «сила» инициации определяет различия в трансляции двух мРНК: акты

инициации на каждой молекуле мРНК β -глобина происходит в 1,7 раза чаще, чем на мРНК α -глобина. Другими словами, мРНК β -глобина «сильнее» с точки зрения инициации. Тем не менее в ретикулоцитах количества синтезируемых молекул α - и β -глобинов оказываются эквимоллярными за счет того, что количество «слабой» α -глобиновой мРНК в клетках соответственно больше, чем «сильной» β -глобиновой мРНК. Предполагается, что 5'-концевая последовательность мРНК β -глобина имеет какие-то структурные характеристики, определяющие ее более сильное сродство к 40S рибосомным частицам. Это, однако, лишь гипотетическая модель, и, по-видимому, в эукариотических системах конкуренция между разными мРНК за лимитирующие РНК-связывающие факторы инициации играет более весомую роль, чем конкуренция за рибосомные частицы (см. подразд. 16.3.2).

В то же время в мире эукариот имеются и примеры совершенно очевидного участия рибосомных частиц в дискриминации мРНК. Наиболее яркие из них рассмотрены в подразд. 14.3.8.2. Например, факторнезависимые IRES вирусных РНК (вируса гепатита С и пикорнаподобных вирусов насекомых) обеспечивают высокое сродство малой рибосомной субъединицы к этим мРНК; здесь налицо дискриминация мРНК в пользу вирусной РНК именно самой рибосомной частицей, независимо от факторов инициации. Впрочем, и другие факторзависимые IRES, такие как IRES пикорнавирусов млекопитающих (см. подразд. 14.3.3), также осуществляют дискриминацию мРНК в пользу вирусных РНК прежде всего за счет своего сродства непосредственно к малой рибосомной субъединице. Имеются многочисленные свидетельства о том, что 5'-нетранслируемые области некоторых «сильных» клеточных мРНК содержат участки, комплементарные участкам рибосомной РНК малой рибосомной субъединицы. Предполагается, что именно комплементарность участков мРНК и рибосомной РНК может способствовать дискриминации в пользу этих мРНК, обеспечивая им дополнительное сродство к рибосомной частице, а следовательно, особую «силу» инициации трансляции.

16.3.2. Дискриминация мРНК посредством мРНК-связывающих факторов инициации

Как уже отмечалось, эукариотические факторы инициации могут быть, хотя и несколько условно, подразделены на две группы: рибосомосвязывающие белки и мРНК-связывающие белки. В большинстве эукариотических клеток мРНК-связывающие факторы инициации, eIF4F и eIF4B, представлены в молярных количествах, меньших, чем молярные количества мРНК; другими словами, имеет место дефицит мРНК-связывающих факторов инициации. Следовательно, существует конкуренция между различными мРНК за связывание с этими белками. Эта ситуация отличается от описанной для прокариот, у которых наблюдается свободная конкуренция между иницирующими рибосомными частицами за связывание с участками инициации (RBS) на мРНК. У эукариот мРНК могут конкурировать между собой за компоненты инициации до организации последних в иницирующий рибосомный комплекс. В таком случае, если различные мРНК имеют различную степень сродства к лимитирующему мРНК-связывающему фактору инициации, именно это будет определять «силу» матриц в инициации их трансляции.

Два мРНК-связывающих фактора инициации, eIF4F и eIF4B, могут рассматриваться в качестве возможных инициаторных компонентов, осуществляющих дискриминацию матриц. Оба фактора присутствуют в эукариотических клетках в ограниченных количествах; также было показано, что они имеют различную степень сродства к разным мРНК (их 5'-концевым последовательностям). Во многих случаях (например, в случае неразмножающихся клеток, таких как ретикулоциты) ситуация с белком eIF4F особенно напряжена: его кэп-связывающая субъединица eIF4E, доступная для формирования eIF4F-комплекса, может присутствовать в таких клетках в количествах менее 0,1 молекулы на одну рибосому. В связи с этим полноценный eIF4F представляется главным лимитирующим компонентом аппарата инициации трансляции. С другой стороны, eIF4B, обладающий неспецифической РНК-связывающей активностью, возможно, необходим для эффективной инициации в количестве многих копий на одну мРНК.

Примером весьма конкурентоспособной клеточной мРНК может служить мРНК, кодирующая ферритин — белок, формирующий молекулярные «контейнеры» для запасаения и хранения ионов трехвалентного железа в клетках эукариот. Когда эта мРНК активируется и транслируется *in vitro* или *in vivo*, она «одерживает победу» в конкуренции с другими клеточными мРНК. Было показано, что за такую «силу» инициации во многом ответственны специальные вторичная и третичная структуры («FR-элемент») в 5'-нетранслируемой области, вблизи кэп-структуры ферритиновой мРНК (см. далее, рис. 16.6). Этот элемент позитивной регуляции ферритиновой мРНК может рассматриваться в качестве избирательного сильного участка связывания лимитирующего мРНК-связывающего фактора инициации.

Проблема конкуренции между различными мРНК за связывание с лимитирующим («дискриминаторным») фактором инициации была особенно подробно изучена, как теоретически, так и экспериментально, в случаях клеток, зараженных вирусами, или бесклеточных систем трансляции с вирусными РНК (Тач с сотр., 1981). На основе этих исследований были сделаны следующие выводы: во-первых, мРНК вируса и хозяйской клетки конкурируют друг с другом за связывание с компонентом, осуществляющим дискриминацию матриц, до их взаимодействия с иницирующим 40S рибосомным комплексом; во-вторых, этот компонент (фактор инициации) присутствует в хозяйской клетке в ограниченных количествах; в-третьих, существует иерархия всех мРНК по степени их сродства к этому компоненту. Было показано, что РНК вируса энцефаломиокардита (ЕМС) является более «сильной», чем мРНК клетки-хозяина. (Существуют свидетельства того, что сродство РНК вируса ЕМС к eIF4B на порядок сильнее, чем у «средней» мРНК хозяйской клетки.) Однако хозяйские мРНК оказались «сильнее», чем некоторые типы реовирусных РНК. Последние, тем не менее, успешно конкурируют с мРНК клетки-хозяина, поскольку присутствуют в зараженной клетке в очень больших количествах в связи с их необычно высокой продукцией.

Среди клеточных мРНК существует класс матриц, которые «слабы» в конкуренции за фактор инициации и обнаруживаются в основном в полирибосомах малого размера и в свободных мРНК-частицах. Исследование этой проблемы привело к заключению, что их невысокая конкурентоспособность обусловлена присутствием связанного белка. Возможно, это белок YB (Y-box protein), основной мажорный компонент мРНКП, рассматриваемый в подразд. 2.4. Удаление бел-

ка (например, с помощью обработки фенолом) приводит к повышению конкурентоспособности таких мРНК в бесклеточных системах трансляции. В то же время связанная форма белка, по всей видимости, находится в равновесии со свободной формой; таким образом, данная ситуация может просто отражать тот факт, что рассматриваемые мРНК имеют более слабое сродство к факторам инициации, чем к белку — компоненту мРНК, который препятствует связыванию факторов инициации. В любом случае при анализе проблемы трансляционной дискриминации эукариотических мРНК конкуренцию между мРНК-связывающими факторами инициации и другими мРНК-связывающими белками необходимо всегда принимать во внимание.

16.3.3. Модуляция трансляционной дискриминации при тотальных изменениях скоростей элонгации или инициации

Ситуация, типичная для эукариот, когда инициация трансляции определяется лимитирующим мРНК-связывающим фактором инициации, предоставляет интересную возможность регуляции экспрессии «слабых» мРНК путем тотального изменения скорости элонгации. Действительно, тотальное ингибирование элонгации приводит к тому, что лимитирующий фактор инициации, например eIF4F с его «кэп»-связывающей субъединицей eIF4E, находится в свободном (не связанном с мРНК) состоянии дольше, чем в случае быстрой элонгации, ослабляя таким образом конкуренцию. В этих условиях «слабые» мРНК получают больше шансов на инициацию трансляции и, следовательно, их уровень экспрессии повышается. Эксперименты с ингибиторами элонгации, такими как циклогексимид, подтвердили данные предположения. Например, циклогексимид, ингибируя трансляцию мРНК клетки-хозяина, стимулирует трансляцию «слабых» РНК реовирусов в зараженных клетках и в бесклеточных системах. Точно так же клеточные мРНК, слабо транслируемые из-за помех, вызываемых мРНК-формирующими белками, транслируются более эффективно после общего ингибирования синтеза белка (элонгации), вызываемого циклогексимидом.

Феномен стимуляции трансляции «слабых» мРНК при ингибировании тотальной скорости элонгации может играть в клетке важную физиологическую роль. Дело в том, что мРНК, кодирующие цитокины, протоонкогены и другие белки, ответственные за переход клеток из состояния покоя в состояние размножения (G_0 - G_1 -переход), относятся к классу «слабых». Следовательно, любое временное замедление процесса трансляционной элонгации в клетке может приводить к стимуляции инициации трансляции данных мРНК и, таким образом, давать импульс клеточной активации и/или пролиферации. Это может происходить, например, в результате Ca^{2+} /кальмодулининдуцированного фосфорилирования eEF2 (см. подразд. 12.4.2) при митогенетической стимуляции находящихся в покое клеток.

Подобный же эффект может быть вызван тотальным ускорением инициации трансляции в клетке. Так, суперпродукция самой дефицитной субъединицы фактора инициации eIF4F — белка eIF4E — вызывает стимуляцию покоящихся клеток и даже их переход в злокачественное состояние. Этот эффект можно объяснить, как и в вышеупомянутом случае тотального замедления элонгации: количество полного eIF4F-комплекса как лимитирующего фактора инициации транс-

ляции в клетке возрастает, и он становится доступным для «слабых» мРНК, к которым относятся мРНК протоонкогенов *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*. Точно такой же эффект вызывается фосфорилированием eIF4E-связывающего белка, индуцирующим освобождение дополнительных количеств активного eIF4E из неактивных комплексов eIF4E•4E-VP (см. подразд. 16.2.2). Таким образом, повышение уровня содержания в клетке лимитирующего компонента инициации может приводить к ослаблению трансляционной дискриминации и к эффективной экспрессии нового набора матриц («слабых» мРНК).

Противоположный эффект на трансляционную дискриминацию может оказывать фосфорилирование фактора eIF2 α в ответ на недостаток гема, отсутствие ростовых факторов, аминокислотное голодание, тепловой шок или вирусные инфекции (см. подразд. 16.2.1).

В результате фосфорилирования eIF2 становится менее доступным для участия в процессе инициации. Так как eIF2 — фактор, связывающийся с рибосомой и превращающий пассивную 40S рибосомную частицу в активный 40S инициаторный комплекс, то чем меньше eIF2 доступно рибосомным частицам, тем меньше в клетке иницирующих рибосом. В таких условиях «сильные» мРНК удерживают на себе лимитирующие мРНК-связывающие компоненты инициации, такие как eIF4F и eIF4B, и трансляция «слабых» мРНК становится еще менее эффективной.

Рассуждая таким образом, можно предположить, что модуляция трансляционной дискриминации на уровне инициации может быть достигнута также путем изменения количества или активности мРНК-формирующего белка, такого как YB (см. подразд. 2.4). Увеличение содержания подобного белка или его мРНК-связывающей активности (например, в результате модификаций типа фосфорилирования-дефосфорилирования) должно ускорять удаление мРНК-связывающих факторов инициации из комплекса с мРНК и, таким образом, приводить к ослаблению дискриминации, т. е. к стимуляции трансляции «слабых» мРНК. Добавление свободной «слабой» мРНК или нетранслируемой (например, бессмысловой) РНК в бесклеточную систему (или суперпродукция такой РНК в клетке) должно иметь обратный эффект: белок мРНК оказывается связан и перераспределен по большему количеству молекул РНК («разбавлен»), и лимитирующие мРНК-связывающие факторы инициации функционируют практически только на «сильных» мРНК.

Некоторые вирусы используют другой, более радикальный способ изменения профиля дискриминации и переключения инициации трансляции преимущественно на вирусные мРНК. Например, многие пикорнавирусы (энтеровирусы, риновирусы и афтовирусы) индуцируют протеолитическую деградацию субъединицы eIF4G фактора инициации eIF4F и, тем самым, выключают кэп-зависимую инициацию на клеточных мРНК. Внутренняя инициация на полиовирусной мРНК становится преимущественной. Интересно, что вирус-кодируемые протеиназы, такие как протеиназа 2A полиовируса и протеиназа Lb вируса ящура, разрезают eIF4G на две части, N-концевую, которая связывается с eIF4E, и C-концевую, взаимодействующую с eIF4A (и с eIF3), связывая таким образом кэп-связывающую и хеликазную функции eIF4F. Соответственно было показано, что C-концевой продукт расщепления eIF4G, возможно, в комплексе с eIF4A не активен в кэп-зависимой инициации, но сильно стимулирует внутреннюю инициацию с участием IRES и вообще инициацию на некэпированных мРНК.

16.4. Регуляция инициации короткими открытыми рамками считывания (uORF)

В принципе мРНК эукариотических клеток, в отличие от мРНК прокариот, моноцистронна, т.е. каждая мРНК кодирует только одну полипептидную цепь (см. подразд. 2.3.1 и 14.3). Обычно эта цепь соответствует одному функциональному белку, но мРНК многих эукариотических вирусов могут кодировать длинные полипептидные цепи, которые уже после их синтеза нарезаются специальными протеазами на более короткие фрагменты, формирующие отдельные функциональные белки. Хотя вирусные РНК полицистронны, в эукариотических клетках инициация происходит лишь на первом цистроне, а для инициации трансляции внутренних кодирующих последовательностей (цистронов) вирусных РНК используются либо соответствующие фрагменты РНК («субгеномные» РНК), либо специальные структурные модули (IRES), связывающие рибосомные частицы независимо от 5'-концевой последовательности (см. подразд. 14.3.3 и 14.3.8). Другими словами, реинициация трансляции очередного цистрона после терминации трансляции предыдущего цистрона в эукариотических клетках, как правило, не происходит.

В то же время в эукариотических клетках существуют мРНК, в которых основной кодирующей последовательности предшествуют одна или несколько коротких открытых рамок считывания (uORF, *upstream Open Reading Frames*) со своими собственными колонами инициации и терминации. Более того, у млекопитающих по крайней мере 35 % всех мРНК имеют такие uORF. Таким образом, исходя из механизма сканирования мРНК иницирующими рибосомными частицами с кэпированного 5'-конца, можно считать, что в указанных случаях трансляция основной кодирующей последовательности должна происходить вслед за терминацией на предшествующей короткой ORF в результате реинициации. При этом, так же как у прокариот (см. подразд. 15.3.2), реинициация может происходить на иницирующем кодоне, расположенном либо за кодоном терминации предшествующей ORF, т.е. ближе к 3'-концу, либо при перекрывании нуклеотидной последовательности ORF и основной кодирующей последовательности, ближе к 5'-концу относительно терминирующего кодона короткой ORF. Показано, что для успешной реинициации нужна uORF длиной не более 20 кодонов.

В настоящее время имеется лишь гипотетическое объяснение того факта, что реинициация возможна после трансляции коротких ORF и практически невозможна после длинных (белок-кодирующих) ORF. Предполагается, что после инициации трансляции либо eIF3, либо eIF4G (а может быть, и полный eIF4F) могут некоторое короткое время удерживаться на внешней стороне 40S субъединицы транслирующей 80S рибосомы, так что они не успевают соскочить до терминации трансляции короткой uORF и могут помочь осуществиться новой инициации. Однако критическим моментом в реинициации является возможность связывания терминировавшей 40S субъединицы с инициаторной тРНК (Met-tRNA_i) в комплексе с eIF2 и ГТФ. Очевидно, что этот тройственный комплекс никак не может сопровождать транслирующую рибосому — его место на контактирующей стороне 40S субъединицы занято 60S субъединицей рибосомы, и он должен успеть прийти извне за время поиска нового иницирующего кодона после терминации.

В целом наличие предшествующей ORF должно ослаблять экспрессию последующей кодирующей последовательности. Такое ингибирование или ослабление

обусловлено низкой эффективностью реинициации в клетках эукариот: как правило, только часть терминированных рибосом остается связанной с мРНК и способна начать поиск нового иницирующего кодона. Однако в ряде случаев и при определенных условиях иницирующий кодон короткой предшествующей ORF может быть «проигнорирован» сканирующей рибосомой, или же эффективность реинициации может быть повышена благодаря каким-то структурным особенностям мРНК, что обеспечивает эффективную трансляцию основной кодирующей последовательности. С другой стороны, ингибиторный эффект коротких ORF на трансляцию основных кодирующих последовательностей может быть усилен под действием определенных внутренних или внешних факторов, главный из которых — доступность инициаторного тройственного комплекса Met-tRNA_i•eIF2•GTP после терминации трансляции uORF (см. подразд. 16.4.1). Таким образом, короткие ORF, часто предшествующие основным кодирующим последовательностям в эукариотических мРНК, представляют собой важный и специфический для эукариот элемент регуляции белкового синтеза на уровне трансляции. В большинстве случаев эффект коротких ORF не зависит от их нуклеотидной последовательности; важна лишь их длина, количество, расстояния между ними (если их больше одной) и расстояние до основной кодирующей последовательности.

16.4.1. Ингибирование реинициации, независимое от нуклеотидной последовательности предшествующей ORF

Классический пример регуляции инициации короткими открытыми рамками считывания — трансляционная регуляция синтеза дрожжевого фактора транскрипции GCN4. GCN4 мРНК содержит четыре очень коротких uORF, расположенных в длинной (590 нуклеотидов) лидерной последовательности мРНК на значительном расстоянии (150 — 360 нуклеотидов) от кодона инициации основной кодирующей последовательности (рис. 16.2). Ди- и трипептидные последовательности, синтезируемые на этих uORF, скорее всего, не играют никакой роли в ингибировании инициации на последующей (основной) кодирующей последовательности GCN4 мРНК. Ингибирование имеет место в нормальных условиях, когда в среде достаточно питательных веществ. Однако в условиях голодания ин-

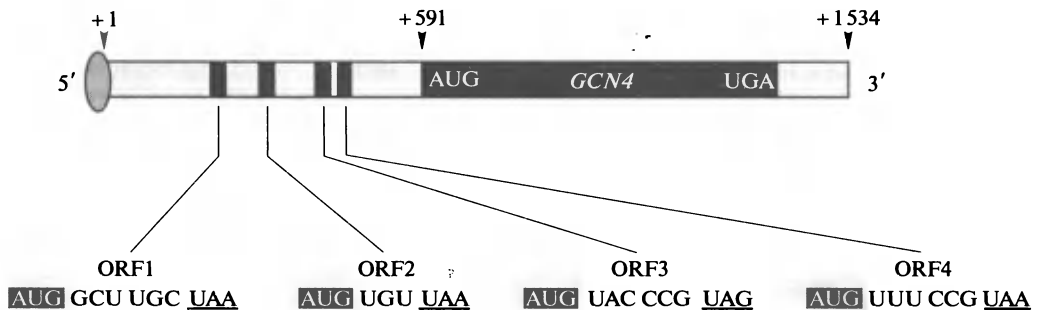


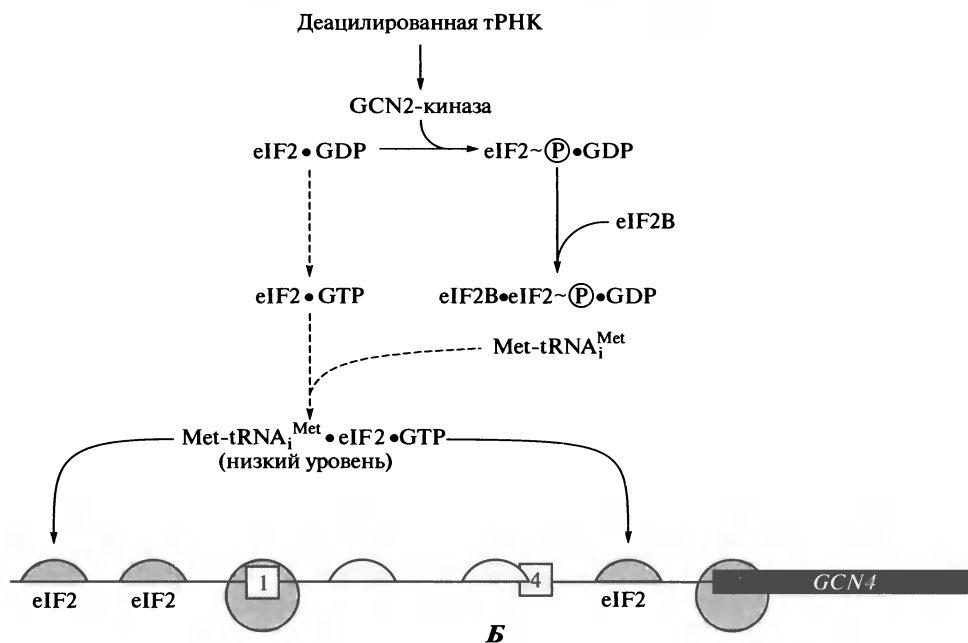
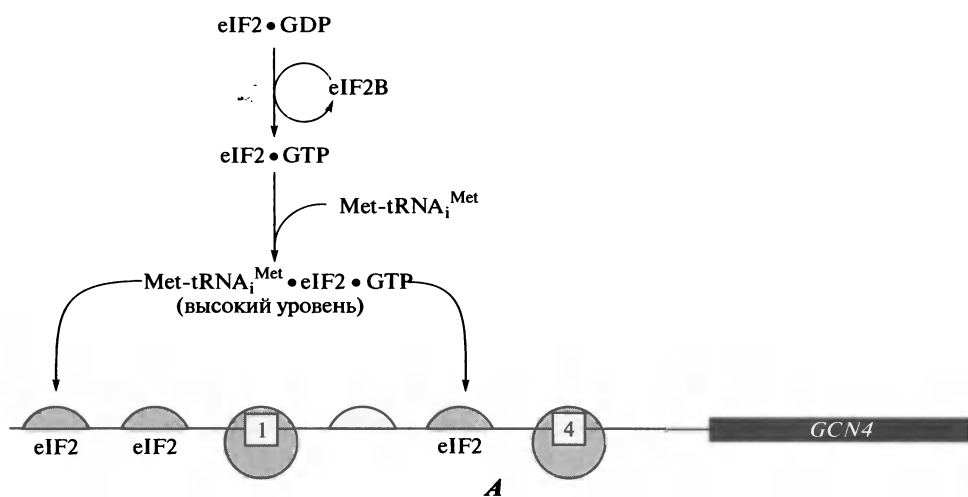
Рис. 16.2. Схема расположения открытых рамок считывания (ORF) в дрожжевой GCN4 мРНК.

Четыре очень короткие рамки считывания (uORF) предшествуют основной последовательности, кодирующей фактор транскрипции GCN4.

Hinnebusch et al. (1993) in *Translational Regulation of Gene Expression 2* (Ilan, ed.), pp. 87—115, Plenum Press, New York

гибирование сильно ослабляется или вообще отсутствует. «Дерепрессия» *GCN4* коррелирует с фосфорилированием eIF2, вызванным голоданием. Было обнаружено, что именно фосфорилирование eIF2 GCN2-киназой контролирует эффективность реинициации на старте основной кодирующей последовательности *GCN4* мРНК.

В основе модели, объясняющей регуляторный эффект предшествующих ORF на трансляцию основной кодирующей последовательности, лежит предположение, что после терминации трансляции короткой ORF 40S субъединицы терминировавших рибосом, оставшиеся связанными с цепью мРНК, могут возобновлять сканирование нуклеотидной последовательности в отсутствие инициаторного тройственного комплекса Met-tRNA_i^{Met}•eIF2•GTP. В данном случае трой-



ственный комплекс приобретаетается рибосомной частицей в ходе сканирования. Доступность (концентрация) инициаторного тройственного комплекса в среде определяет, как скоро сканирующая субъединица его приобретет. Если расстояние до следующего иницирующего кодона небольшое или если инициаторного тройственного комплекса в среде мало, то сканирующая рибосомная частица не успевает его приобрести, не узнает иницирующего кодона и продолжает сканировать цепь РНК, не транслируя, а следовательно, не терминируя и не диссоциируя от цепи мРНК.

На примере *GCN4* мРНК была предложена модель (рис. 16.3), согласно которой реинициация на стартовом кодоне основной кодирующей последовательности обратным образом зависит от уровня активного (нефосфорилированного) eIF2. В общих чертах, если не вдаваться в подробности процесса, предполагаемый сценарий выглядит следующим образом. Рибосомная частица с полным набором факторов инициации, которые связываются с 5'-концом мРНК, иницирует трансляцию на первой короткой ORF, транслирует ее и терминирует. В условиях нормального уровня питательных веществ активный eIF2 присутствует в клетке в достаточных количествах, поэтому терминировавшие рибосомные частицы быстро связываются снова с тройственным комплексом Met-tRNA_i•eIF2•GTP. Иницируя трансляцию на каждой короткой ORF, рибосомные частицы теряются при каждой терминации. Таким образом, большая часть рибосом оказывается потеряна в процессах терминации и реинициации на четырех ORF и поэтому не может достичь инициаторного кодона основной кодирующей последовательности *GCN4* РНК. В условиях голодания содержание тройственного комплекса Met-tRNA_i•eIF2•GTP не столь велико из-за фосфорилирования eIF2 GCN2-киназой. Следовательно, рибосомные частицы после терминации на первой ORF сканируют последующий участок, но не успевают связаться с тройственным комплексом и реиницировать на второй, третьей и четвертой ORF, в результате чего большинство рибосомных частиц достигает инициаторного кодона кодирующей

←
Рис. 16.3. Схема механизма регуляции трансляции основной последовательности, кодирующей фактор транскрипции *GCN4*, предшествующими короткими рамками считывания (uORF).

А: в нормальных условиях, когда уровень содержания инициаторного тройственного комплекса Met-tRNA_i•eIF2•GTP в клетке высок, терминировавшая рибосомная 40S субъединица после прочтения uORF 1 быстро приобретает этот комплекс и становится способной снова иницировать трансляцию на следующей uORF (для простоты две промежуточные uORF опущены, и на схеме приведена лишь последняя uORF 4). Однако рибосомная частица, терминировавшая на uORF 4, не удерживается на мРНК и диссоциирует — по-видимому, вследствие особых свойств GC-богатой нуклеотидной последовательности сразу вслед за терминирующим кодоном.

Б: в условиях аминокислотного голодания деацилированная тРНК индуцирует активацию GCN2-киназы, фосфорилирующей eIF2, что приводит к связыванию фактора eIF2B и тем самым к понижению уровня инициаторного тройственного комплекса Met-tRNA_i•eIF2•GTP в клетке. Терминировавшая рибосомная 40S субъединица после прочтения uORF 1 не успевает приобрести этот комплекс и потому не может иницировать трансляцию на следующей uORF. Она продолжает сканирование, но в течение длинного пути до инициаторного кодона основной кодирующей последовательности успевает приобрести тройственный комплекс и иницирует трансляцию кодирующей последовательности транскрипционного фактора *GCN4*. Пунктирными стрелками обозначен пониженный уровень продуктивности соответствующих шагов.

Jackson et al. (2007) in *Translational Control in Biology and Medicine* (Mathews, Sonenberg and Hershey, eds.), pp. 197–223, CSHL Press, New York.

Hinnebusch et al. (2007) in *Translational Control in Biology and Medicine* (Mathews, Sonenberg and Hershey, eds.), pp. 225–268, CSHL Press, New York

последовательности *GCN4* путем сканирования без трансляции ORF. В соответствии с этой моделью большинство сканирующих частиц во время прохождения достаточно длинного участка мРНК между четвертой ORF и началом кодирующей последовательности *GCN4* успевают связать тройственный комплекс с Met-тРНК, и таким образом инициируют трансляцию.

16.4.2. Ингибирование реинициации, зависимое от нуклеотидной последовательности предшествующей ORF

В отличие от механизма, описанного выше, в некоторых случаях ингибиторный эффект коротких uORF может сильно зависеть от специфической нуклеотидной последовательности ORF, и, в частности, он может определяться аминокислотной последовательностью закодированного в ней короткого пептида. Такой пептид функционирует в *цис*-положении, т.е. оставаясь еще связанным с транслирующей рибосомой. Механизм действия таких пептидов заключается, по-видимому, в специфическом взаимодействии с самой транслирующей рибосомой и

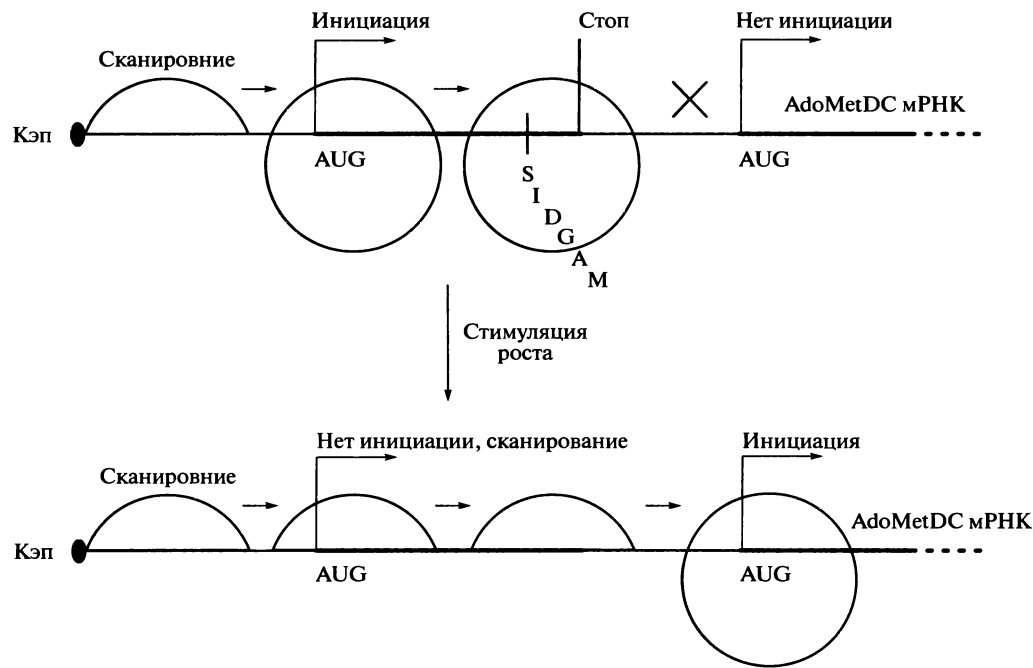


Рис. 16.4. Схема механизма подавления трансляции основной последовательности, кодирующей S-аденозилметионинкарбоксилазу (AdoMetDC), пептидом, синтезируемым на предшествующей короткой рамке считывания (uORF). Гексапептид Met-Ala-Gly-Asp-Ile-Ser (MAGDIS), синтезированный на рибосоме, транслирующей uORF, и удерживаемый ею, блокирует терминацию трансляции и дальнейшее продвижение рибосомы вдоль мРНК (вверху). В условиях стимуляции роста клетки сканирующая рибосома игнорирует инициаторный кодон uORF, продолжает сканирование и инициирует на основной последовательности, кодирующей AdoMetDC (внизу).

Hill and Morris (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 726–731. Ruan et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 17905–17910

вызываемой этим задержке терминации (см. подразд. 12.2.4). Примерами мРНК с предшествующими ORF, кодирующими такие ингибиторные пептиды, служат мРНК S-аденозилметиониндекарбоксилазы млекопитающих; дрожжевая мРНК *CPA1*, кодирующая фермент биосинтеза аргинина; мРНК gp48 цитомегаловируса человека. Длина пептидов в вышеуказанных случаях колеблется в пределах от 6 до 25 остатков; было показано, что именно их аминокислотная последовательность, но не последовательность собственно ORF, имеет решающее значение для ингибиторного эффекта.

Ингибирование трансляции короткими ORF, предшествующими основной кодирующей последовательности мРНК, может регулироваться некоторыми *транс*-факторами, а также условиями окружающей среды. Так, трансляция мРНК S-аденозилметиониндекарбоксилазы, которая ингибируется предшествующей ORF в покоящихся Т-клетках, стимулируется при активации Т-клеток (рис. 16.4). Эффективная трансляция мРНК S-аденозилметиониндекарбоксилазы в стимулированных Т-клетках, так же как и в клетках других линий (не Т-типа), является, по всей видимости, следствием неэффективного использования («игнорирования») инициаторного кодона ORF сканирующими рибосомными частицами в данных условиях.

Аналогично, ORF *CPA1* мРНК препятствует инициации трансляции последующей (основной) рамки считывания только в присутствии аргинина. Удаление аргинина снижает ингибиторный эффект ORF. Механизм этой регуляции не ясен. Возможно, удаление аргинина либо ухудшает инициацию на инициаторном кодоне ORF, либо приводит к ослаблению взаимодействия ингибиторного пептида с рибосомой.

16.4.3. ORF-зависимое шунтирование мРНК сканирующими рибосомами

35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV, Cauliflower Mosaic Virus) содержит длинную лидерную последовательность с семью короткими ORF. Для трансляции этой вирусной полицистронной кодирующей последовательности необходимо узнавание ее 5'-конца, несущего кэп-структуру, инициаторным рибосомным комплексом и последующее сканирование им лидерной последовательности. Как и ожидалось, короткие ORF в составе лидерной последовательности оказывают ингибиторный эффект на инициацию трансляции на основных вирусных цистронах. Более того, в соответствии с предсказанием вторичной структуры почти вся лидерная последовательность складывается в единую длинную составную шпильку, которая, очевидно, далее формирует определенную третичную структуру и представляет собой высокоэнергетический барьер на пути сканирующего рибосомного комплекса. Все это делает CaMV РНК весьма слабо транслируемой как *in vivo* в растениях, не являющихся хозяевами для вируса, так и *in vitro* в бесклеточных системах, приготовленных из экстрактов данных растений. Однако в клетках растений-хозяев (цветной капусты и некоторых других) и бесклеточных системах на основе их экстрактов не наблюдается ингибирования трансляции, что, скорее всего, обусловлено присутствием в цитоплазме клеток-хозяев специального клеточного фактора, но в любом случае эффект отмены ингибирования зависит от первых коротких ORF.

Оказалось, что когда CaMV РНК трансляционно активна, иницирующие рибосомные частицы не сканируют всю лидерную последовательность с ее высоко-

развитыми вторичной и третичной структурами, а пропускают ее центральную часть, как бы «перепрыгивая» через нее. Для такого *шунтирования* необходимо считывание первых трех коротких ORF. Возможно, трансляция этих ORF вызывает расплетание основания составной шпильки и вхождение рибосомных частиц в структурированную зону, где определенное структурное окружение индуцирует перескок сканирующей рибосомной 43S частицы с участка непосредственно за третьей короткой ORF на участок внутри седьмой короткой ORF. Далее нетранслирующая (сканирующая) частица движется в направлении 3'-конца и инициирует трансляцию на первом инициирующем кодоне основной кодирующей последовательности CaMV РНК.

16.5. Трансляционная репрессия

Так же как и у прокариот, эукариотическая трансляционная репрессия представляет собой запрет инициации трансляции в результате специфического взаимодействия белка-репрессора с уникальным элементом вторичной (или третичной) структуры мРНК — оператором, расположенным в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК. Связывание белка со структурным элементом 5'-НТО стабилизирует вторичную (или третичную) структуру данного участка РНК и тем самым блокирует либо начальное взаимодействие инициирующей рибосомной 40S субъединицы с прилегающей к кэп-структуре последовательностью мРНК, либо продвижение сканирующего рибосомного комплекса по мРНК в направлении участка инициации, либо доступность самого инициаторного кодона для рибосомного инициаторного комплекса (рис. 16.5). Эта классическая модель трансляционной репрессии эукариотических мРНК путем подавления инициации белком-репрессором была подтверждена целым рядом наблюдений, показавших роль 5'-НТО в регуляции трансляции.

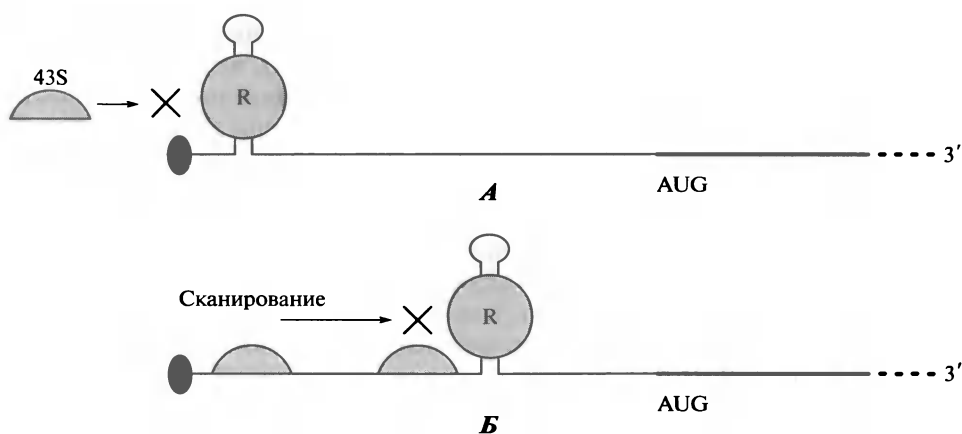


Рис. 16.5. Общая схема трансляционной репрессии эукариотических мРНК.

А: шпилька, стабилизированная белком-репрессором, находясь вблизи 5'-конца мРНК, препятствует посадке свободного инициирующего 43S рибосомного комплекса на кэп-структуру со связанным кэп-связывающим белком eIF4E/eIF4F.

Б: шпилька, стабилизированная белком-репрессором, является препятствием для инициирующего 43S рибосомного комплекса, сканирующего 5'-НТО мРНК

16.5.1. Репрессия путем запрещения посадки иницирующего рибосомного комплекса на мРНК

16.5.1.1. Регуляция трансляции ферритиновой мРНК

Наиболее подробно изученным случаем трансляционной репрессии-депрессии путем взаимодействия структурного элемента 5'-НТО со специфически активируемым-инактивируемым репрессором является регуляция трансляции мРНК, кодирующей Fe³⁺-связывающий белок ферритин. Репрессор ферритиновой мРНК представляет собой белок с молекулярной массой 98 кДа. Он узнает участок 5'-НТО длиной 28 нуклеотидов, обозначаемый IRE (*Iron Responsive Element*), который расположен довольно близко к кэп-структуре. Нуклеотидная последовательность IRE имеет тенденцию образовывать «дефектную» шпильку (т.е. шпильку с выпетливаниями), а так как последовательности, соседствующие с IRE с обеих сторон, взаимно комплементарны и формируют двуспиральную «стеблевую» структуру (FL, *flanking region*), то в целом IRE оказывается частью длинной составной шпильки, способной складываться в третичную структуру. В отсутствие железа (Fe³⁺) белок-репрессор (называемый также IRE-BP, *IRE Binding Protein*) имеет сильное сродство к IRE и фиксирует определенную конформацию всей составной шпильки. Вследствие того, что эта стабилизированная структура со связанным белком находится вблизи (около 10 нуклеотидных остатков) 5'-конца мРНК, т.е. вблизи кэп-структуры, связывающей eIF4F, она создает физическую помеху посадке иницирующей рибосомной частицы (43S) на кэп-прилегающую нуклеотидную последовательность 5'-НТО, тем самым блокируя инициацию трансляции ферритиновой мРНК. В присутствии ионов железа сродство IRE-BP к IRE исчезает, и белок уходит с IRE, репрессирующая конформация составной шпильки дестабилизируется, давая таким образом возможность иницирующему рибосомному комплексу сесть на мРНК и начать сканирование с последующей инициацией трансляции (рис. 16.6). Продукт трансляции, ферритин, начинает связывать избыточные количества Fe³⁺, появившиеся в клетке.

Интересно, что репрессорный белок IRE-BP оказался идентичен аконитазе — ферменту, превращающему цитрат в изоцитрат и содержащему в своем активном центре так называемый 4Fe-4S-(железо-серный) кластер, который необходим для активности и правильной конформации фермента. Недостаток железа (Fe³⁺) в среде приводит к разрушению 4Fe-4S-кластера, потере аконитазной активности и изменению конформации белка, превращающему его в IRE-BP, репрессор ферритиновой мРНК. Таким образом, один и тот же белок выполняет две совершенно различные, не связанные друг с другом функции: он является ферментом аконитазой, когда его железо-серный кластер насыщен железом, и репрессором IRE-BP в случае отсутствия железа и разрушения 4Fe-4S-кластера.

Аналогичная система негативной регуляции с участием IRE и IRE-BP имеет место в случае мРНК эритроид-специфичной синтазы δ-аминолевулиновой кислоты (eALAS). Представляет интерес тот факт, что у различных мРНК, кодирующих ферритин и eALAS, расположение IRE относительно 5'-конца мРНК эволюционно консервативно: IRE всегда расположен в пределах первых 40 нуклеотидов 5'-НТО. Вставка дополнительной нуклеотидной последовательности между кэп-структурой и IRE приводит к ослаблению или исчезновению трансляцион-

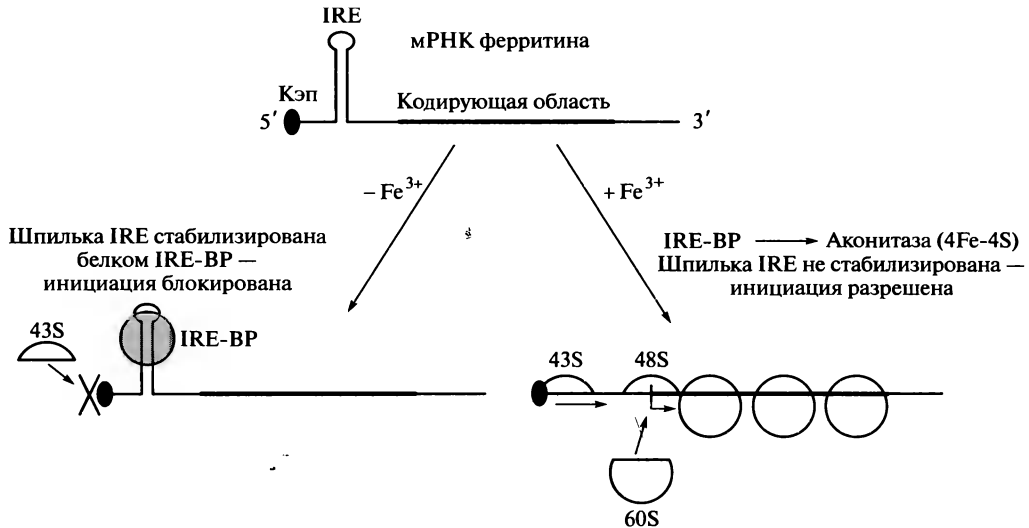


Рис. 16.6. Трансляционная регуляция синтеза ферритина.

5'-НТО ферритиновой мРНК содержит шпильку IRE, которая специфически связывает стабилизирующий ее белок IRE-BP. Белок активен в связывании шпильки только при недостатке Fe^{3+} в клетке; в этих условиях комплекс шпильки с белком препятствует посадке иницирующего рибосомного 43S комплекса на 5'-конец мРНК, и, таким образом, трансляция мРНК не происходит — ферритин не синтезируется. В присутствии Fe^{3+} белок превращается в фермент аконитазу и не способен связываться со шпилькой; нестабильная шпилька не представляет препятствия для посадки иницирующего рибосомного 43S комплекса на 5'-конец мРНК — происходит сканирование 5'-НТО и затем трансляция — Fe^{3+} -связывающий белок ферритин синтезируется.

Roualt et al. (1996) in *Translational Control* (Hershey, Mathews and Sonenberg, eds.), pp. 335—262, CSHL Press, New York

ной репрессии. Другими словами, IRE должен быть расположен достаточно близко к 5'-концу мРНК с кэп-структурой, чтобы блокировать инициацию трансляции после взаимодействия с IRE-BP. Это наблюдение согласуется с предложенной моделью, в соответствии с которой связывание IRE-BP с IRE предотвращает взаимодействие рибосомного 43S инициаторного комплекса с участком мРНК, прилегающим к кэп-структуре (см. рис. 16.6, рис. 16.5, А).

16.5.1.2. Регуляция трансляции мРНК орнитиндекарбоксилазы и с-тус мРНК

5'-НТО эукариотических мРНК часто имеют развитую вторичную структуру, которая в принципе должна препятствовать эффективной инициации их трансляции. Значительную роль в трансляции таких мРНК могут играть различные клеточные РНК-хеликазы (включая eIF4A), способствующие расплетанию («плавлению») двуспиральных участков в 5'-НТО. Как и в случае репрессии ферритиновой мРНК, роль репрессорных белков может заключаться в узнавании и стабилизации таких структур, результатом чего может быть не только блокирование взаимодействия инициаторного 43S рибосомного комплекса с последовательностями мРНК, прилегающими к кэп-структуре (см. рис. 16.5, А), но и предотвращение хеликазного расплетания стабилизированных вторичных структур. Специальные стимулирующие воздействия, эффекторы или условия окружающей среды, приводящие к удалению репрессора, открывают путь для рабо-

ты хеликаз и тем самым обуславливают активацию таких мРНК. По-видимому, подобный механизм действует в случаях мРНК орнитиндекарбоксилазы и *c-myc* мРНК.

Орнитиндекарбоксилаза (ODC) катализирует первый этап биосинтеза полиаминов. Индукция фермента на уровне трансляции наблюдается в ответ на клеточную пролиферацию, а также на изменение уровня полиаминов. 5'-НТО мРНК орнитиндекарбоксилазы содержит очень стабильную вторичную структуру (5'-концевую длинную GC-богатую шпильку), которая сама по себе оказывает ингибирующий эффект на трансляцию. Факторы роста способны ослаблять это конститутивное ингибирование трансляции, возможно, путем стимуляции активности РНК-хеликаз или соответствующих факторов инициации (комплекс eIF4A•eIF4B•eIF4F). В то же время было показано, что существует белок молекулярной массой 58 кДа, который может специфически связываться с участком 5'-НТО, прилегающим к шпильке. Этот белок отсутствует в тканях с высоким постоянным уровнем синтеза орнитиндекарбоксилазы и присутствует в тканях, в которых ее трансляция регулируется. Можно предположить, что этот 5'-НТО-связывающий белок является репрессором, предотвращающим плавление 5'-концевой стабильной вторичной структуры РНК-хеликазами (факторами инициации) в процессе инициации, но диссоциирует из комплекса с мРНК в результате некоторых воздействий, разрешая тем самым «плавление» шпильки и инициацию. Была экспериментально показана потеря сродства этого белка к участку связывания на 5'-НТО в ответ на окислительные условия.

Похожая ситуация наблюдается в случае *c-myc* мРНК, структура 5'-НТО которой тоже оказывает на трансляцию ингибирующее воздействие. В начале этой мРНК присутствует стабильная шпилька. Однако ингибирование может наблюдаться только в некоторых, но не во всех клеточных линиях и системах трансляции. Более того, уровень трансляции *c-myc* мРНК претерпевает очень сильные изменения, зависящие от процессов оогенеза и сперматогенеза в клетках *Xenopus*. Возможны следующие альтернативы: либо гипотетический репрессорный белок, стабилизирующий структуру 5'-НТО и предотвращающий ее расплетание, присутствует в разных клетках в различных количествах и подвержен регулированию в процессе развития, либо некоторые системы обладают более высокой РНК-хеликазной активностью, чем другие, и эта активность может изменяться в процессе развития.

Репрессия трансляции путем запрещения посадки иницирующего рибосомного комплекса на мРНК может быть воспроизведена искусственно путем создания химерной мРНК, содержащей в составе 5'-НТО 5'-концевую шпилечную структуру, обладающую специфическим сродством к какому-либо мРНК-связывающему белку. Например, шпилечная структура с высоким сродством к белку оболочки бактериофага MS2 (см. рис. 15.6) была вставлена в 5'-НТО кэп-содержащего транскрипта гена хлорамфениколацетилтрансферазы; было обнаружено, что белок оболочки является высокоэффективным репрессором такой мРНК как *in vitro*, в бесклеточных системах ретикулоцитов кролика и проростков пшеницы, так и *in vivo*, в клетках человека линии HeLa и дрожжей. Таким же образом белок сплайсосом U1A был превращен в трансляционный репрессор, когда участок связывания этого белка (довольно нестабильная шпилька) из малой РНК U1 был перенесен в 5'-НТО мРНК хлорамфениколацетилтрансферазы. В обоих случаях трансляционная репрессия вызывалась образованием стабильного РНК-белкового комплекса поблизости от кэп-структуры, который предотвращал взаи-

моделью инициаторных рибосомных частиц (43S инициаторного комплекса) с мРНК. Эксперименты показали, что такой тип репрессии трансляции действительно может широко использоваться в эукариотических клетках.

16.5.2. Репрессия путем стабилизации структурного барьера на пути сканирующего рибосомного комплекса

Другой механизм репрессии осуществляется в случаях, когда взаимодействие элементов 5'-НТО с белком-репрессором не подавляет связывания иницирующего 43S рибосомного комплекса с мРНК, а приводит к образованию барьера, который не может быть преодолен 43S комплексом, движущимся (сканирующим) от кэп-структуры к инициаторному кодону (см. рис. 16.5, **Б**). Такой механизм используется, например, в случае трансляционной репрессии мРНК тимидилатсинтазы человека продуктом ее собственной трансляции, т. е. тимидилатсинтазой (по принципу обратной связи). Здесь 30-нуклеотидная шпилька в 5'-НТО специфически взаимодействует с тимидилатсинтазой, что и приводит к подавлению инициации. Шпилька отстоит от кэп-структуры примерно на 80 нуклеотидов и включает в себя кодон инициации. В кодирующей последовательности той же самой мРНК имеется еще один участок связывания тимидилатсинтазы, роль которого не ясна. Во всяком случае показано, что тимидилатсинтаза — фермент, катализирующий превращение дУМФ в дТМФ, — является специфическим мРНК-связывающим белком и трансляционным репрессором своей собственной мРНК.

Существуют указания на то, что дигидрофолатредуктаза (DHFR) человека также способна специфически связываться со своей собственной мРНК и репрессировать ее трансляцию.

16.6. Маскирование мРНК

Типичные примеры маскированных мРНК — матрицы, синтезированные в течение оогенеза и сперматогенеза и хранящиеся в ооцитах и сперматоцитах, иногда довольно долго. После оплодотворения яйца и в процессе раннего эмбриогенеза происходит демаскирование материнских мРНК, запасенных в период оогенеза и хранившихся в маскированной форме (см. подразд. 16.6.2). Существуют также поразительные примеры маскирования и хранения мРНК в дифференцирующихся соматических клетках взрослого организма в течение продолжительного времени (см. подразд. 16.6.3).

Хранящиеся мРНК действительно «укрыты» от множества воздействий, включая инициацию трансляции, деградацию и полиаденилирование-деаденилирование. Это может быть принято в качестве определения маскирования, в отличие от репрессии, когда блокирована только одна функция — трансляция. Наиболее замечательным было открытие, что, в отличие от репрессии, в маскирование мРНК вовлечены 3'-нетранслируемые области (3'-НТО) мРНК. Специфические взаимодействия маскирующих белков или особых малых РНК (микроРНК, miсroRNA) с определенными участками 3'-НТО оказались ответственными за инициацию процессов, приводящих к выключению функциональных активностей соответствующей мРНК.

16.6.1. Маскированные мРНК в ооцитах и сперматоцитах

Пионерская работа в области изучения механизмов маскирования была сделана Н. Стандартом с коллегами (1990). Было показано, что ооциты двустворчатого моллюска *Spisula solidissima* содержат большие количества маскированных мРНК, кодирующих малую субъединицу рибонуклеотидредуктазы и циклин А. Оплодотворение дает начало избирательному демаскированию этих основных хранимых мРНК цитоплазмы ооцитов, в то время как трансляция некоторых ранее активных мРНК прекращается. В условиях *in vitro* демаскирование двух названных мРНК достигалось обработкой солями в высоких концентрациях, что, как предполагалось, должно было приводить к диссоциации маскирующих белков от мРНК. Выяснилось, что с предполагаемым маскирующим белком («диссоциирующим фактором») связывался специфический участок в середине 3'-НТО, а вовсе не 5'-конец и не 5'-НТО (рис. 16.7). В экспериментах Н. Стандарт по поиску участков мРНК, ответственных за маскирование-демаскирование, был использован другой — избирательный — подход для удаления белка с мРНК: обработка синтетическими антисмысловыми РНК, комплементарными определенным участкам мРНК, включая 5'-НТО, кодирующую область и 3'-НТО. Конкурируя за связывание с мРНК, антисмысловые РНК должны были вытеснять белки, связанные с соответствующими участками мРНК. Демаскирование мРНК происходило только в случае обработки маскированной мРНК с помощью антисмысловой РНК, комплементарной участку в средней части 3'-НТО. Удаление из мРНК последовательности 3'-НТО с участком, ответственным за маскирование («маскирующим элементом»), также приводило к стимулированию трансляции. В последующей серии экспериментов белок ооцитов молекулярной массой 82 кДа был идентифицирован как специфически связывающийся с «маскирующим элементом» в составе 3'-НТО мРНК малой субъединицы рибонуклеотидредуктазы, и было показано, что его присутствие в маскированных мРНК коррелирует с трансляционной инактивацией соответствующих мРНК (см. рис. 16.7).

Позднее было показано, что на самом деле маскирование предполагает участие целой совокупности белков и процессов (см. далее), а белок, узнающий нуклеотидную последовательность «маскирующего элемента» 3'-НТО и связывающийся с ней, лишь инициирует процесс маскирования и потому может быть обозначен как *первичный маскирующий белок*. Прежде всего, при инициации маскирования выключается инициация трансляции — в основном за счет блокирования кэп-структуры на 5'-конце мРНК белком или белками, которые образуют комплекс с



Рис. 16.7. «Маскирующий элемент» в 3'-НТО мРНК рибонуклеотидредуктазы и первичный «маскирующий белок» ооцитов двустворчатого моллюска *Spisula solidissima*.

Standart et al. (1990) *Genes Dev.* 4: 2157—2168. Walker et al. (1996) *Develop. Biol.* 173: 292—305

первичным маскирующим белком. Кроме того, было показано, что маскирование материнских мРНК в ооцитах сопровождается существенным укорочением их поли(А)-«хвостов» — от первоначальной длины 200—250 адениловых остатков, с которой мРНК выходит из ядра, до 20—40 нуклеотидов при маскировании в цитоплазме, что также сильно уменьшает их потенциальную способность к трансляции. В маскирование вовлекается большое количество молекул основного РНП-образующего белка YB (Y-box protein). Демаскирование индуцируется фосфорилированием первичного маскирующего белка и связанных с ним белков, формирующих комплекс на 3'-НТО, что приводит как к освобождению кэп-структуры от блокирующего белка, так и к стимуляции полиаденилирования мРНК цитоплазматической поли(А)-полимеразой и восстановлению длинного поли(А)-«хвоста», необходимого для эффективной трансляции.

Решающая роль 3'-НТО в маскировании мРНК в процессах оогенеза и сперматогенеза была подтверждена элегантным генетическим анализом перехода от сперматогенеза к оогенезу у гермафродитных особей нематоды *Caenorhabditis elegans*. Во время развития гермафродита предшественники зародышевых клеток сначала, на личиночной стадии развития, превращаются в сперматоциты, а затем в ооциты во взрослых особях. Трансляция так называемой *fem-3* мРНК приводит к сперматогенезу, а последующее маскирование этой мРНК определяет переключение на оогенез. Было показано, что точечные мутации в средней части ее 3'-НТО (на участке длиной 250 нуклеотидов), так же как и делеция этого центрального участка 3'-НТО, делают невозможным маскирование *fem-3* мРНК и, следовательно, запрещают оогенез. Дальнейшие исследования привели к выводу, что

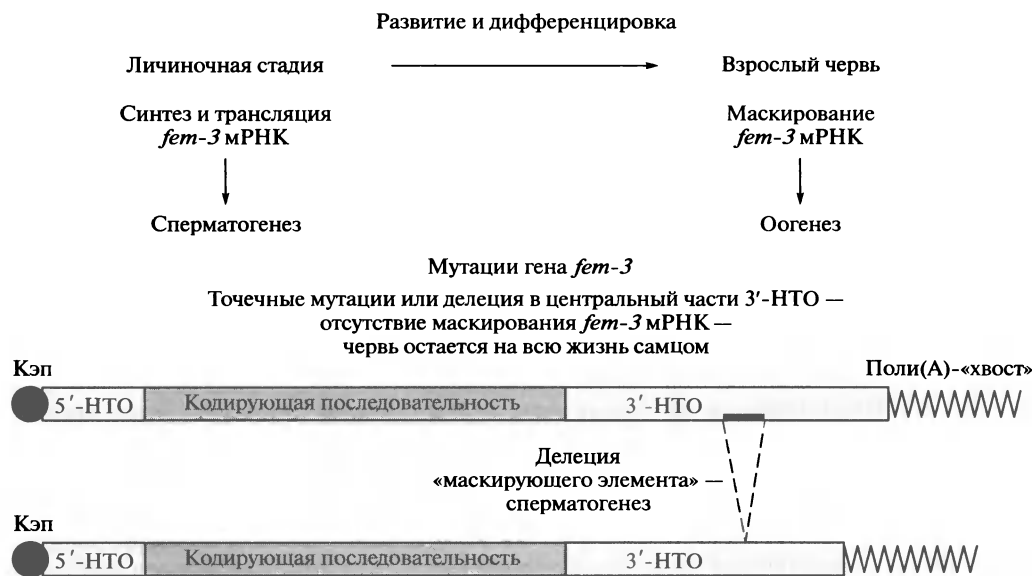


Рис. 16.8. «Маскирующий элемент» в 3'-НТО *fem-3*-мРНК гермафродитной линии круглого червя *Caenorhabditis elegans*.

В процессе развития червя на личиночной стадии происходит синтез и трансляция *fem-3* мРНК, отвечающей за сперматогенез и, следовательно, за самцовый фенотип. При переходе во взрослую стадию *fem-3* мРНК маскируется и начинается оогенез; червь становится самкой. Мутации или делеции в средней части 3'-НТО *fem-3* мРНК приводят к невозможности маскирования.

Ahringer and Kimble (1991) *Nature* 349: 346—348

эти мутационные изменения 3'-НТО *fem-3* мРНК нарушают участок связывания белка, функция которого заключается в индукции маскирования (рис. 16.8).

Сперматогенез — другая классическая биологическая система, в которой процессы маскирования и демаскирования мРНК играют решающую роль. Здесь транскрипция прекращается во время мейоза или на ранних постмейотических стадиях, а трансляция мРНК, кодирующих основные белки сперматозоидов (такие как протамины), задерживается на много дней. Таким образом, мРНК запасается в маскированной форме в виде цитоплазматических мРНП-частиц и транслируется только на поздних стадиях сперматогенеза. В частности, было показано, что у мышей мРНК, кодирующая протамин, накапливается на стадии круглых сперматид в форме нетранслируемых мРНП, хранится в таком виде до одной недели и начинает транслироваться лишь на стадии продолговатых сперматид. Доказано, что именно 3'-НТО протаминовой мРНК ответственна за такой тип регуляции трансляции.

16.6.2. Демаскирование мРНК в раннем эмбриогенезе

В процессе раннего эмбрионального развития животных наблюдается целый ряд стадий, сопровождающихся демаскированием запасенных в яйцеклетке маскированных мРНК, а затем маскированием и демаскированием определенных групп мРНК в связи с переходом к очередной стадии развития. Самые ранние стадии — дробление, бластула, иногда начало гастрюляции — обеспечиваются целиком запасенной материнской мРНК; в этот период еще не происходит транскрипции в ядре и транспорта мРНК в цитоплазму, так что ядро может быть даже удалено без последствий для начального периода эмбриогенеза. В дальнейшем, когда ядра в клетках ранних эмбрионов начинают выдавать новосинтезированную мРНК, наблюдается явление периодичности работы клеточного ядра (Нейфах, 1959): информация (очевидно, в виде мРНК) поступает из ядра в цитоплазму не непрерывно, а порциями в определенные короткие периоды, и каждая порция поступает в цитоплазму в маскированном виде, определяя развитие на последующих, иногда значительно отстоящих по времени стадиях. «Отработавшие» мРНК в цитоплазме обычно тем или иным способом «выключаются» и затем подвергаются деградации, но в ряде случаев переходят в маскированную форму и хранятся в клетках до следующего периода их активности. -

16.6.2.1. Ранний эмбриогенез лягушки

При изучении оогенеза у лягушки (*Xenopus*) было показано, что основным элементом 3'-НТО мРНК, ответственным за маскирование многих материнских мРНК (т.е. «маскирующим элементом» мРНК), является U-богатый участок с консенсусной последовательностью UUUUAU , обозначаемый СРЕ (*Cytoplasmic Polyadenylation Element*), который участвует также в индукции деаденилирования (при маскировании) и полиаденилирования (при демаскировании) «хвоста» мРНК в цитоплазме. СРЕ имеет специфическое сродство к белку СРЕВ (*CPE-Binding protein*), выступающему в роли первичного маскирующего белка. Связывание СРЕВ с СРЕ индуцирует присоединение белка Maskin к 3'-НТО-связанному СРЕВ. В свою очередь, белок Maskin, сидящий на белке СРЕВ, имеет сильное сродство

к малой — кэп-связывающей — субъединице фактора инициации eIF4F (eIF4E) и, взаимодействуя с ней, блокирует механизм кэп-зависимой инициации трансляции (рис. 16.9). В процессе демаскирования фосфокиназы фосфорилируют белок CPEB, в результате чего связанный с ним белок Maskin теряет сродство к eIF4E, и таким образом происходит разблокирование кэп-зависимой инициации трансляции.

На некотором расстоянии от CPE по направлению к 3'-концу мРНК расположен другой структурный элемент 3'-НТО: — гексануклеотидная последовательность AAUAAA, на которой собирается белковый комплекс, непосредственно участвующий в деаденилировании и полиаденилировании «хвоста» мРНК. В состав этого комплекса входят, в частности, мультисубъединичный белок CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), связанный с AAUAAA, деаденилирующий фермент — поли(А)-специфическая рибонуклеаза (PARN) — и поли(А)-полимераза (Gld2). При маскировании именно поли(А)-специфическая рибонуклеаза укорачивает поли(А)-«хвост» мРНК. При демаскировании, в ответ на соответствующую стимуляцию, происходит активация фосфокиназы, которая фосфорилирует первичный маскирующий белок CPEB. Фосфорилированный CPEB взаимодействует с вышеуказанным комплексом на AAUAAA, что приводит

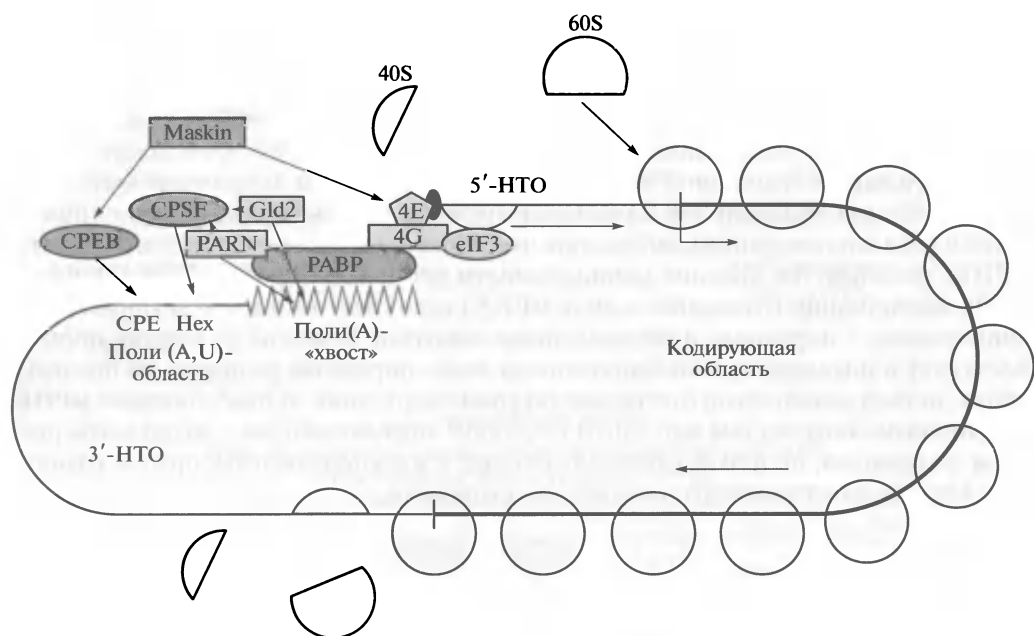


Рис. 16.9. Первичные события в процессе маскирования мРНК в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. Связывание первичного маскирующего белка CPEB с «маскирующим элементом» CPE в poly(A,U)-районе 3'-НТО, последующее связывание белка Maskin с белком CPEB и образование комплекса между 3'-НТО-связанным белком Maskin и кэп-связанным белком eIF4E приводят к блокаде инициации трансляции мРНК. Связывание мультисубъединичного белка CPSF с гексануклеотидной последовательностью AAUAAA (Hex) в poly(A,U)-районе 3'-НТО индуцирует сборку комплекса, включающего поли(А)-специфическую рибонуклеазу PARN и поли(А)-полимеразу Gld2, с последующим частичным деаденилированием «хвоста» мРНК и потерей значительной части PABP.

Richter (2007) *Trends Biochem. Sci.* 32: 279—285

к удалению из комплекса поли(А)-специфической рибонуклеазы PARN и к полиаденилированию (удлинению) «хвоста» поли(А)-полимеразой Gld2.

Следует отметить, что в описанном сценарии маскирования-демаскирования мРНК фигурируют только начальные стадии маскирования и соответственно конечные стадии демаскирования. Стадии, следующие за выключением инициации трансляции и деаденилированием мРНК при маскировании — освобождение от рибосом, массивированное комплексообразование с белком УВ, олигомеризация и конденсация формирующихся РНП-частиц, — пока совершенно не изучены, так же как и соответствующие стадии начала процесса демаскирования мРНК.

16.6.2.2. Ранний эмбриогенез мухи

Раннее эмбриональное развитие и морфогенез *Drosophila* включают в себя ряд взаимосвязанных событий маскирования и демаскирования мРНК в яйцеклетке и клетках раннего эмбриона. В частности, установление anteriорально-постериоральной (передне-задней) оси эмбриона мухи определяется, в первую очередь, внутриклеточной локализацией и сопряженным с ней демаскированием трех мРНК, маскируемых в процессе оогенеза и запасаемых в яйцеклетке — *oskar* мРНК и *nanos* мРНК на постериоральном полюсе и *bicoid* мРНК на anteriоральном полюсе.

Одна из наиболее изученных маскированных материнских мРНК в яйцах *Drosophila* — *nanos* мРНК, кодирующая белок Nos — морфоген, определяющий абдоминальную сегментацию эмбрионов, в том числе путем блокирования экспрессии других мРНК. До оплодотворения *nanos* мРНК находится в яйцеклетке в маскированном, т.е. трансляционно не активном и стабилизированном, состоянии. Маскирование осуществляется с участием 3'-НТО. Ее специальный участок TSE связывает первичный маскирующий белок Smaug, который и индуцирует маскирование данной мРНК — процесс, приводящий к образованию стабильных мРНК-частиц как запасной формы хранения мРНК в неоплодотворенной яйцеклетке. В то же время Smaug выполняет и другую функцию — немедленного выключения трансляционной активности *nanos* мРНК, независимо от образования маскированных мРНК: он связывает белок Cup (аналог лягушачьего Maskin), который взаимодействует с кэп-связанным eIF4E, вытесняя eIF4G, т.е. разрушая основной мРНК-связывающий инициаторный комплекс eIF4F и тем самым блокируя инициацию трансляции.

После оплодотворения часть *nanos* мРНК локализуется на заднем полюсе отложенного яйца — на полярных гранулах — и демаскируется. «Заякоривание» *nanos* мРНК на постериоральном полюсе определяется специальным участком в ее 3'-НТО. Нуклеотидные последовательности участков 3'-НТО, необходимых для такой постериоральной локализации и маскирования *nanos* мРНК, перекрываются. Именно локализация *nanos* мРНК на заднем полюсе яйца приводит к ее демаскированию — по-видимому, за счет конкурентного вытеснения первичного маскирующего белка Smaug. Таким образом, эти наблюдения выявляют механизм, приводящий к демаскированию мРНК через локализацию мРНК, т.е. путем прикрепления к специфическим пространственным структурам внутри клетки с участием 3'-НТО. Так как *nanos* мРНК активна в трансляции лишь будучи локализованной на заднем полюсе яйца, то белок Nos синтезируется только там и далее диффундирует к переднему полюсу, формируя тем самым обратный градиент

вдоль передне-постериоральной оси яйца, а затем вдоль передне-задней оси раннего эмбриона (рис. 16.10).

Было обнаружено, что белок Nos представляет собой РНК-связывающий белок, узнающий гомологичные нуклеотидные последовательности, обозначаемые NRE (*Nos Response Element*), в составе 3'-НТО двух других материнских мРНК — *hunchback* мРНК, распределенной равномерно по всему яйцу, и *bicoid* мРНК, локализуемой на переднем (антериоральном) полюсе яйца (см. далее). Взаимодействие белка Nos с NRE этих мРНК блокирует их трансляцию. Уровень экспрессии *hunchback* мРНК таким образом постепенно уменьшается в направлении от переднего полюса яйца и эмбриона к заднему (см. рис. 16.10, внизу), и этот градиент является основным фактором правильной абдоминальной сегментации эмбриона. В норме *bicoid* мРНК, локализуемая на переднем полюсе, не должна встречаться с постериорально локализованным белком Nos, но в случае появления делокализованных молекул их экспрессия будет заблокирована этим белком. Не совсем ясно, однако, действительно ли ингибирующий эффект белка Nos на эти две мРНК сопровождается реальным маскированием мРНК, или данный эффект представляет собой трансляционную инактивацию без консервации

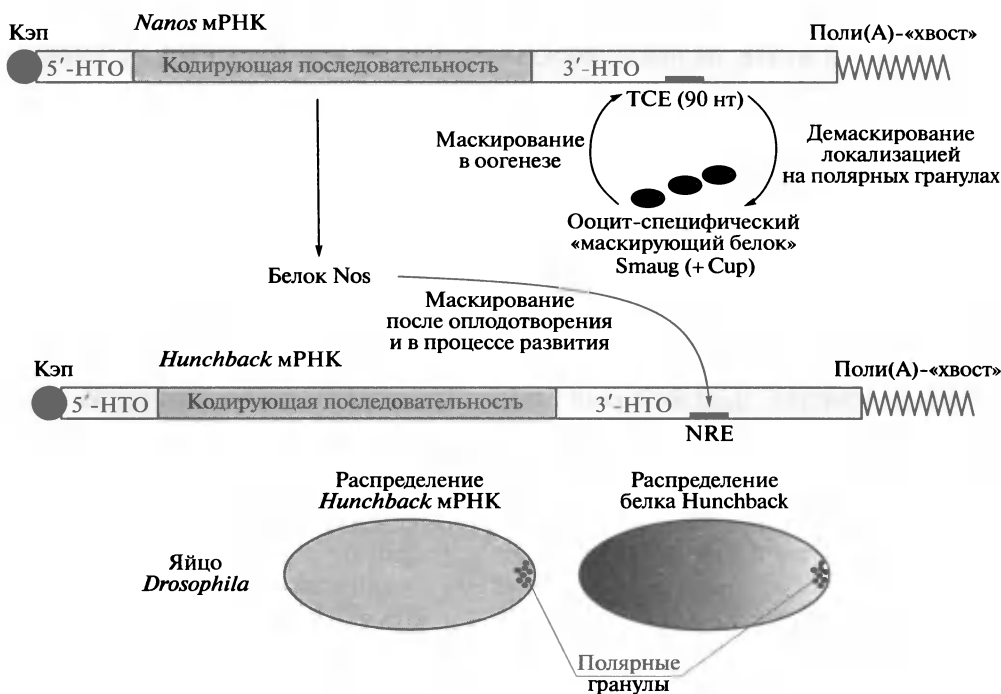


Рис. 16.10. Схема демаскирования *nanos* мРНК, кодирующей постериоральный детерминант (белок Nos), на полярных гранулах и сопряженного маскирования *hunchback* мРНК, кодирующей антериоральный детерминант (белок Hunchback), в яйце *Drosophila* после оплодотворения. Результатом является формирование положительного передне-заднего градиента белка Nos и отрицательного передне-заднего градиента белка Hunchback, необходимых для правильной абдоминальной сегментации будущего эмбриона.

Gavis and Lehmann (1994) *Nature* **369**: 315—318. Seydoux (1996) *Curr. Opin. Genet. Develop.* **6**: 555—561. Wickens et al. (1996) in *Translational Control* (Hershey, Mathews and Sonenberg, eds.), pp. 411—450, CSHL Press, New York

мРНК — например, блокирование инициации путем *cup*-взаимодействия с eIF4E (см. ранее). Во всяком случае, что касается *hunchback* мРНК, то была показана ее быстрая деградация после трансляционной инактивации.

Другой эмбриональный морфоген, локализация которого на постериоральном полюсе яйца дрозофилы определяет развитие абдоминальной части зародыша и линии зародышевых клеток, — это белок Oskar. Кодярующая его мРНК синтезируется в клетках-кормилицах яичников мухи и в маскированной форме транспортируется в ооцит. За маскирование ответствен белок, называемый Bruno, ко-

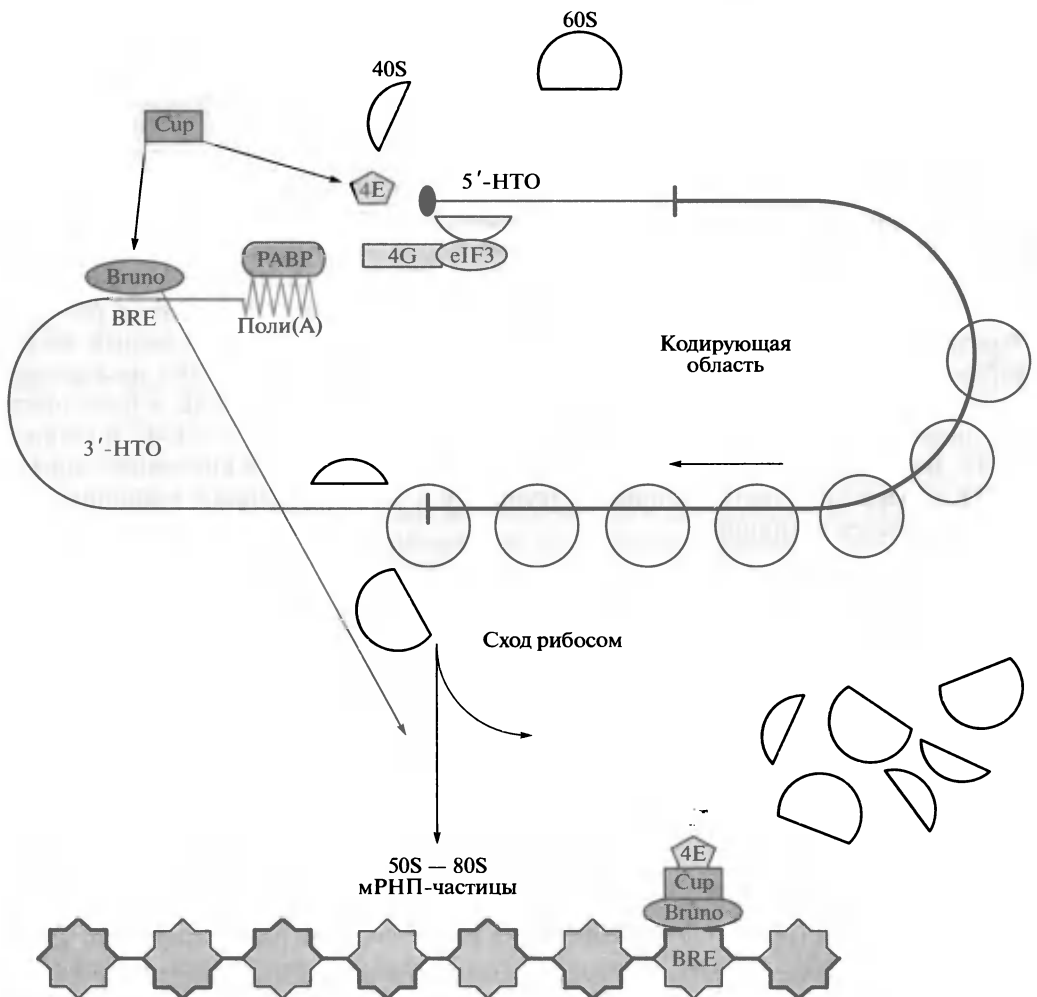


Рис. 16.11. Первичные события в процессе маскирования *oskar* мРНК в клетках-кормилицах яичников *Drosophila*: связывание первичного «маскирующего белка» Bruno с «маскирующим элементом» BRE в 3'-НТО, последующее связывание белка Cup с белком Bruno и блокада инициации трансляции в результате связывания 3'-НТО-связанного белка Cup с кэп-связанным белком eIF4E. Одновременно и независимо 3'-НТО-связанный белок Bruno индуцирует образование мРНП и олигомеризацию индивидуальных мРНП в крупные (50S—80S) частицы с маскированной мРНК.

Wilhelm et al. (2003) *J. Cell Biol.* **163**: 1197—1204. Chekulaeva et al. (2006) *Cell* **124**: 521—533

торый узнает специфическую нуклеотидную последовательность, обозначаемую BRE (*Bruno Responsive Element*), в 3'-НТО *oskar* мРНК (рис. 16.11). Белок Bruno, связанный с последовательностью BRE, взаимодействует, как и в описанном ранее случае *nanos* мРНК, с белком Cup, и взаимодействие Cup с eIF4E препятствует связыванию eIF4E с eIF4G и сборке eIF4F, тем самым блокируя кэп-зависимую посадку инициаторного 43S рибосомного комплекса на мРНК. Однако, как было прямо показано в этом случае (Чекулаева и др., 2006), главным событием, индуцируемым связыванием белка Bruno с последовательностью BRE и независимым от взаимодействия Cup с eIF4E, является сборка крупных (50S — 80S) маскированных мРНК-частиц, включающих в себя олигомеры *oskar* мРНК, недоступные для трансляции и стабильные в клеточном окружении. Очевидно, что в образование этих мРНК-частиц, кроме первичного маскирующего белка Bruno, вовлекается также целый ряд цитоплазматических белков клетки, включая YB в качестве основного РНК-образующего белка, а также поли(А)-связывающий белок (PABP), eIF4E, Cup и др. Демаскирование *oskar* мРНК происходит путем локализации мРНК-частиц на постериоральном полюсе ооцита.

Маскированная *bicoid* мРНК яйцеклетки после оплодотворения демаскируется в результате ее локализации на anteriоральном полюсе. Продукт ее трансляции, белок Bicoid, специфически связывается с районом BBR (*Bicoid Binding Region*) в 3'-НТО *caudal*-мРНК, определяющей дифференцировку задней части эмбриона. Будучи присоединенным к 3'-НТО, Bicoid напрямую, без посредства других белков типа Cup, взаимодействует с кэп-связанным eIF4E и блокирует инициацию трансляции, препятствуя взаимодействию eIF4E с eIF4G и сборке eIF4F. Возможно, это инициирует дальнейший процесс — маскирование *caudal* мРНК в передней части эмбриона, тогда как в хвостовой части эмбриона эта мРНК остается активной.

16.6.3. Маскирование и демаскирование мРНК в процессе клеточной дифференцировки

Наиболее полно изученный случай маскирования и демаскирования мРНК во время финальных стадий клеточной дифференцировки — это мРНК, кодирующая эритроидную 15-липоксигеназу (LOX) (рис. 16.12). LOX мРНК синтезируется на ранних стадиях эритропоэза, маскируется, т.е. переходит в форму нетранслируемого и стабильного цитоплазматического мРНК, и хранится в такой форме на протяжении всех последующих стадий, вплоть до поздней стадии периферических ретикулоцитов. Демаскирование LOX мРНК и синтез закодированного в ней фермента происходят во время созревания ретикулоцитов до эритроцитов. Фермент атакует фосфолипиды, индуцируя тем самым деградацию митохондрий в процессе окончательного созревания эритроцитов. Длинная 3'-НТО ретикулоцитной LOX мРНК содержит характерную последовательность, в которой обогащенный пиримидинами (в основном цитидиловыми остатками) мотив длиной 19 нуклеотидов повторяется 10 раз. Было обнаружено, что именно этот повторяющийся элемент является ответственным за маскирование LOX мРНК посредством специфического взаимодействия с двумя белками, имеющими молекулярные массы 66 и 43 кДа (эти же белки участвуют в образовании гетерогенных ядерных РНК и потому ранее были обозначены hnRNP-K и hnRNP-E1). Указанные белки (K и E1, или LOX-VP, *LOX-Binding proteins*) входят в состав трансляционно

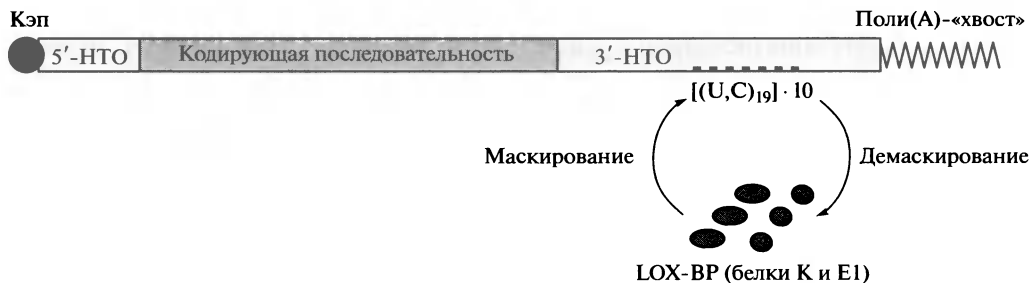
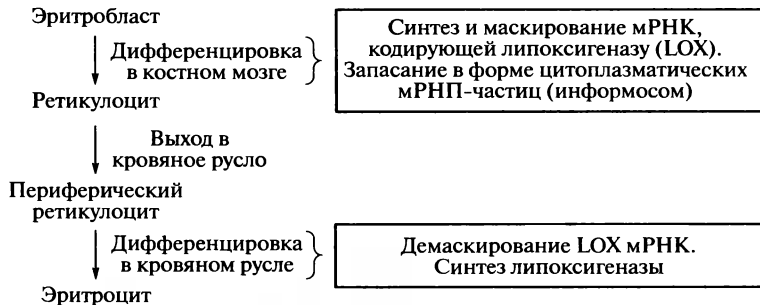


Рис. 16.12. Схема маскирования-демаскирования мРНК, кодирующей липоксигеназу (LOX), в процессе эритропоэза у кролика.

Ostareck et al. (1994) *EMBO J.* 13: 1476–1481

неактивного LOX-РНП в клетках костного мозга и ретикулоцитах. LOX-VP способны также избирательно ингибировать трансляцию гибридных (химерных) чужеродных мРНК, таких как мРНК хлорамфениколацетилтрансферазы или люциферазы, когда они содержат такой же регуляторный элемент в составе своих 3'-НТО. Минимальный участок связывания белков LOX-VP, достаточный для проявления эффекта, составляет от 2 до 4 повторов. Заслуживает внимания тот факт, что LOX-VP функционируют независимо от наличия кэп-структуры, так что в данном случае в процесс маскирования не вовлечены механизмы прямого воздействия маскирующего белка или связанного с ним белка на кэп-связывающий белок eIF4E. Вместе с тем показано, что вследствие посадки LOX-VP на 3'-НТО происходит ингибирование инициации трансляции на последней стадии — стадии присоединения большой (60S) рибосомной субъединицы и формирования 80S рибосомы — посредством какого-то неизвестного механизма.

16.6.4. Участие микроРНК в маскировании мРНК

Открытие малых интерферирующих РНК (siRNA) и микроРНК (miRNA) — полирибонуклеотидов длиной всего от 21 до 24 (редко до 30) нуклеотидных остатков — и исследования их роли в посттранскрипционной регуляции генной экспрессии у высших эукариот (животных и растений) произвели революцию в представлениях об организации регуляторных процессов в клетках многоклеточных организмов (см. обзор: Bartel, D. P., 2004). Оказалось, что белоксинтезирующий аппарат в клетках высших эукариот буквально «купается» в море микроРНК, и большая доля клеточных мРНК находится под их контролем.

У человека насчитываются сотни различных микроРНК, и экспрессия по крайней мере трети его генов, кодирующих белки, контролируется этими микроРНК. В значительной мере контроль осуществляется через индуцируемую молекулами микроРНК избирательную деградацию определенных мРНК, но и избирательное выключение трансляции путем временного ингибирования трансляции и/или маскирования мРНК также играет существенную роль, особенно в клетках животных.

Некоторые микроРНК паразитично консервативны в эволюции. Например, одна из наиболее изученных микроРНК — так называемая *let-7* РНК, управляющая трансляцией нескольких мРНК, которые кодируют белки, необходимые на поздних стадиях эмбрионального развития. Эта микроРНК идентифицирована у широкого круга многоклеточных животных, включая всех позвоночных, иглокожих, асцидий, моллюсков, червей и членистоногих (но не найдена у кишечнополостных). Другие микроРНК менее консервативны; так, первая открытая микроРНК — *lin-4* РНК, контролирующая некоторые мРНК на ранних стадиях эмбриогенеза, — найдена лишь у круглых червей — их классического представителя *Caenorhabditis elegans*. Многие микроРНК тканеспецифичны, и, по-видимому, каждый тип клеток на каждой стадии развития характеризуется своим определенным профилем экспрессии микроРНК, поддерживающих определенный профиль экспрессии мРНК и синтеза белков.

МикроРНК в клетках образуются из специальных некодирующих транскриптов, формирующих длинные двуспиральные шпильки с многочисленными боковыми петлями. В ядре происходит выщепление укороченной шпильки из более длинного транскрипта. После транспорта в цитоплазму шпилька связывается со специальной мультидоменной эндонуклеазой, называемой Dicer, которая вырезает двуспиральный участок длиной около 22 — 24 нуклеотидных пар. Этот дуплекс расплетается хеликазой, и одна из цепей, представляющая собой зрелую микроРНК, передается от Dicer на белковый комплекс, обозначаемый RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), а комплементарная цепь освобождается и разрушается. Основой комплекса RISC является крупный (около 100 кДа) белок, обозначаемый Argonaute; именно с ним оказывается связанной цепь микроРНК. МикроРНК в комплексе с RISC (белком Argonaute) специфически взаимодействует с полностью или частично комплементарными участками в 3'-НТО молекул мРНК, что приводит к инактивации этих мРНК (рис. 16.13). В случаях полной комплементарности на протяжении всей длины микроРНК эндонуклеазный домен белка Argonaute расщепляет цепь мРНК в месте комплементарного взаимодействия, что индуцирует деградацию данной мРНК. Такой механизм инактивации мРНК типичен для растений, а также показан для некоторых микроРНК животных. Именно таким образом действуют малые интерферирующие РНК (siRNA), комплементарные участкам кодирующей части мРНК. Однако при неполной комплементарности участка 3'-НТО и микроРНК расщепления не происходит, и белок Argonaute остается привязанным к 3'-НТО мРНК через микроРНК. Эта ситуация, типичная для клеток животных, приводит к прекращению трансляции данной мРНК посредством еще не исследованного механизма, который, согласно некоторым косвенным свидетельствам, может так или иначе приводить к маскированию мРНК.

В 2000-х гг. в литературе были разноречивые, часто противоречащие друг другу, сообщения о начальных механизмах действия микроРНК на трансляцию (Рихтер, 2008). Так, при изучении ингибирующего действия *let-7* РНК на транс-

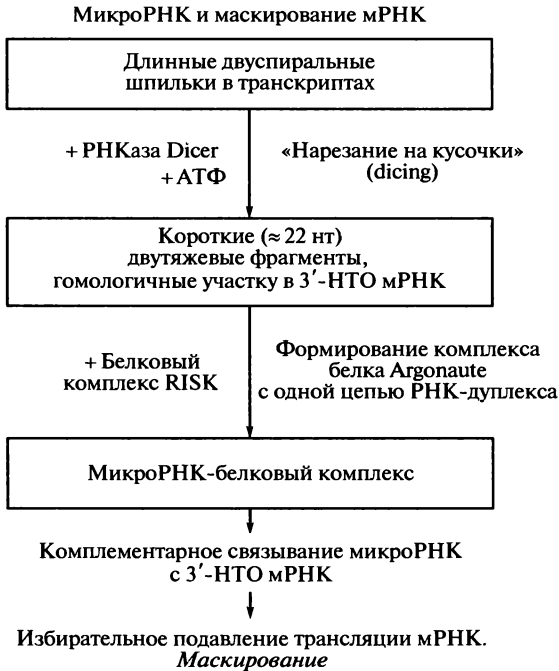


Рис. 16.13. Схема биогенеза регуляторных микроРНК и их действия на мРНК.

Wehner and Sarnow (2007) in *Translational Control in Biology and Medicine* (Mathews, Sonenberg and Hershey, eds.), pp. 297–318, CSHL Press, New York

лянию репортерных мРНК, несущих 3'-НТО с частично комплементарными ей участками, утверждалось, что в первую очередь блокируется кэп-зависимая инициация трансляции (Филипович и др., 2005) и что эта блокада происходит за счет связывания белка Argonaute с кэп-связывающей субъединицей eIF4E — подобно тому, как это описано в случаях индукции маскирования первичными маскирующими белками (см. подразд. 16.6.1 и 16.6.2). Одновременно под действием *let-7* РНК происходит образование крупных (50S — 120S) нетранслируемых мРНК-содержащих частиц, напоминающих мРНК с олигомеризованными мРНК, возникающие при маскировании *oskar* мРНК (см. подразд. 16.6.2.2). Полноразмерные мРНК, переходящие в нетранслируемое состояние под действием микроРНК, обнаруживаются в составе цитоплазматических РНК-гранул, называемых в литературе «стресс-гранулами» (*stress bodies*), «процессирующими гранулами» (*P-bodies*) и т. п. Эти гранулы представляют собой, по-видимому, гетерогенную смесь агрегированных РНК-частиц, только часть из которых служит для деградации заключенной в них РНК, тогда как другая часть является формой хранения маскированных мРНК. Действительно, маскированные мРНК в подобных гранулах содержат как микроРНК, так и белки семейства Argonaute. Однако другие исследования не подтверждают ни зависимости ингибирующего действия микроРНК от наличия кэп-структуры на мРНК, ни взаимодействия белка Argonaute с eIF4E.

Другой механизм, постулированный на основании некоторых экспериментальных данных для ингибирующего действия микроРНК на трансляцию мРНК, заключается в том, что белок Argonaute может связывать некий фактор ини-

циации (eIF6), необходимый, как предполагают, для правильной ассоциации рибосомных субъединиц на инициаторном кодоне мРНК, и тем самым блокировать начало трансляции мРНК. Однако в других экспериментах было показано, что нокаут экспрессии белка eIF6 в клетках не существенен ни для инициации трансляции, ни для ингибирования трансляции под действием микроРНК.

Третий предполагаемый механизм — это индукция деаденилирования мРНК под действием белка Argonaute, связанного с микроРНК, сидящей на 3'-НТО. Было показано, что белок Argonaute привлекает к себе белковый фактор GW182 (типичный компонент «процессирующих гранул»), который в свою очередь активирует ферментативный комплекс деаденилирования мРНК. Но и этот механизм не может быть признан основным и универсальным: трансляция репортерных (химерных) мРНК, в которых нет поли(А)-«хвоста» и которые не способны полиаденилироваться (например, мРНК с 3'-концевой шпилькой от гистоновой мРНК), ингибируется микроРНК так же, как и трансляция соответствующих полиаденилированных мРНК.

В целом накапливающиеся экспериментальные данные и общие соображения все больше наводят на мысль, что основной механизм действия микроРНК и его белкового партнера (Argonaute) должен заключаться в каком-то прямом воздействии на транслирующие полирибосомы. При этом в серии экспериментов было показано, что в начальной фазе воздействия микроРНК рибосомы в полирибосомах сохраняют пептидилтрансферазную активность, но синтезируемый полипептид перестает накапливаться (Рихтер и др., 2006) — возможно, вследствие остановки рибосом и сопутствующей деградации синтезируемых полипептидных цепей.

Следует добавить ко всему вышеизложенному, что микроРНК оказались не только ингибиторами трансляции мРНК, в конце концов приводящими эти мРНК, по крайней мере в ряде описанных случаев, к маскированному состоянию. Появились также и факты стимулирующего действия микроРНК на трансляцию, причем одна и та же микроРНК может оказывать как ингибирующий, так и стимулирующий эффект в зависимости от фазы клеточного цикла (Стейтц и др., 2007). Таким образом, молекулярный механизм (или механизмы) действия микроРНК на полирибосомы остается пока (на момент написания этой книги) полной загадкой.

16.6.5. Гипотетическая модель маскирования мРНК

Практически во всех случаях маскирования мРНК эффект инициируется воздействием белка или комплекса microRNA•Argonaute на 3'-НТО, а проявляется прежде всего в блокировке этапа инициации трансляции на 5'-НТО мРНК и деаденилировании на ее 3'-конце. Возникает вопрос: каким образом события, происходящие на 3'-конце, влияют на 5'-концевые процессы? В настоящее время ответ представляется довольно очевидным: 5'- и 3'-концевые части транслируемой мРНК всегда находятся друг с другом в контакте, обеспечиваемом белками, что приводит к нековалентному замыканию молекулы мРНК в кольцо — так называемой *циркуляризации* мРНК (см. подразд. 14.3.7, рис. 14.16). Поэтому любые воздействия на 3'-НТО могут непосредственно передаваться на 5'-НТО и приводить к ингибированию инициации трансляции.

Однако, как уже указывалось ранее, явление маскирования мРНК далеко не исчерпывается блокированием инициации трансляции и деаденилированием мРНК. Маскированные мРНК существуют в виде рибонуклеопротеидов — мРНП, или информосом. В то же время эукариотическая мРНК и в немаскированной форме взаимодействует с большим количеством белков, формируя мРНП. Следовательно, вопрос состоит в том, какие факторы, процессы или конформационные переходы определяют разницу между маскированными и немаскированными формами мРНП. В частности, к маскированию или демаскированию мРНК могли бы приводить глобальные структурные перестройки мРНП — например, аналогичные конденсации и деконденсации хроматина. Возможно, что взаимодействия 3'-НТО с первичными маскирующими белками или РНП-комплексом microRNA•Argonaute могут индуцировать такие структурные перестройки мРНП-частиц. Другими словами, маскированная форма мРНК может рассматриваться как «конденсированная» форма мРНП (рис. 16.14), в которой мРНК недоступна для функциональных взаимодействий с другими макромолекулами, такими как рибосомы и/или факторы инициации трансляции, поли(А)-полимераза и рибонуклеазы. Эта теория «структурного маскирования» не исключает возможности сохранения пространственной близости 5'- и 3'-концевых частей маскированной мРНК.

В дополнение к иницирующей роли 3'-НТО-связывающих белков и/или комплексов микроРНК с белками семейства Argonaute в маскировании мРНК в качестве важнейшего участника процессов маскирования следует в первую очередь указать на основной (мажорный, «сердцевинный») мРНП-образующий белок YB (Y-box protein) (см. подразд. 16.2.2). Действительно, масштабное маскирование

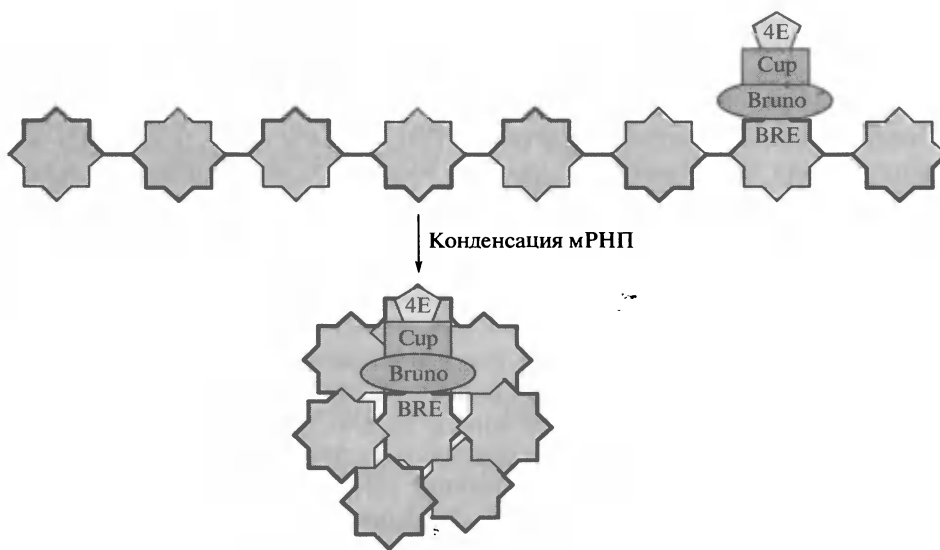


Рис. 16.14. Гипотетическая схема структурной перестройки мРНП на конечной стадии процесса маскирования мРНК: конденсация с участием маскирующих белков и белка YB (серые восьмиугольники).

Цепь мРНК обозначена жирной ломаной линией.

Spirin (1996) in *Translational Control* (Hershey, Mathews and Sonenberg, eds.), pp. 319–334, CSHL Press, New York

мРНК во время оогенеза или сперматогенеза всегда сопровождается накоплением YB в цитоплазме. Суперпродукция белка YB в клетке способствует маскированию цитоплазматических мРНК. Маскированные мРНК всех типов обнаруживаются в комплексе с большим количеством YB. Можно предполагать, что в то время как специфический первичный «маскирующий белок» или комплекс microRNA•Argonaute, связанные с 3'-НТО в количестве одной или нескольких копий, дают начало процессу маскирования, белок YB, неспецифически связывающийся со всей последовательностью мРНК, завершает маскирование и формирует должную четвертичную структуру маскированных мРНК-частиц (Спирин, 1994). Предполагаемая структурная перестройка мРНК типа конденсации может быть функцией белка YB совместно с неким «первичным маскирующим белком» (см. рис. 16.14). Кооперативные взаимодействия множества копий белка YB в составе мРНК могут индуцироваться специфическим первичным 3'-НТО-связывающим «маскирующим» белком, хотя возможно и участие ряда других белков, присутствующих в маскированных мРНК-частицах.

Действительно, в маскированных мРНК-частицах присутствует много «минорных» белков, количество которых не сравнимо с количеством белка YB. Роль этих белков в организации мРНК пока не вполне ясна. К ним относятся факторы инициации трансляции eIF4E и eIF4G; цитоплазматический поли(A)-связывающий белок; некоторые белки гетерогенных ядерных РНП (hnRNP); РНК-связывающие белки TIA-1 и TIAR, содержащие С-концевой прионоподобный домен. Не исключено, что именно последний обеспечивает олигомеризацию маскированных мРНК-частиц в более крупные цитоплазматические гранулы, типа упоминавшихся ранее 50S — 80S «silencing particles», «pseudopolysomes», «stress granules» (SG), «processing bodies» (P-bodies) и т. п. Как отмечалось ранее, в состав маскированных мРНК-частиц (неизвестно, однако, всех ли) входят микроРНК и белки семейства Argonaute. В любом случае вслед за первичными событиями — блокадой инициации трансляции и деаденилированием мРНК — должны следовать этапы схода рибосом с мРНК (освобождения мРНК от рибосом), массивованного связывания белков мРНК (прежде всего, белка YB) с мРНК и формирования мРНК-частиц, включая, возможно, их конденсацию и олигомеризацию.

16.7. Эволюция основных механизмов регуляции трансляции

Если классифицировать различные способы регуляции трансляции с точки зрения их усложнения, а также возрастающей роли (и доли) белков в регуляции, то можно построить схему, представленную на рис. 16.15. Самые примитивные способы, которые можно рассматривать как унаследованные от древнего мира РНК, — те, что основаны на взаимодействиях РНК-РНК и РНК-лиганд, без участия белков. Они сохранились в клетках прокариот, но уже отсутствуют, по-видимому, у эукариот. Привлечение белков на этапе эволюции прокариот значительно усложнило и сделало более точной и гибкой всю регуляцию на уровне трансляции — как через белковые факторы инициации (усложнение которых видно и при переходе от прокариот к эукариотам), так и посредством привлечения белков для прямого негативного контроля транскрибируемости мРНК (репрессоры). У эукариот репрессорная функция белков распространилась на механизмы контроля трансляции через 3'-нетранскрибуемые области мРНК и далее на механизмы



Рис. 16.15. Основные способы регуляции трансляции и их возможная эволюционная взаимосвязь

маскирования мРНК. Наконец, белки «научились» использовать совсем короткие РНК в качестве комплементарных «черных меток» для избирательного «нападения» на специфические мРНК в целях их выключения и/или разрушения (микрорНК-белковые комплексы).

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 16

- Нейфах, А. А. (1959). Использование метода радиационной инактивации ядер для исследования их функции в раннем развитии рыб. *Журнал общей биологии* **20**: 202 — 213.
- Спирин, А. С., Белицина, Н. В., и Айтхожин, М. А. (1964). Информационные РНК в раннем эмбриогенезе. *Журнал общей биологии* **25**: 321 — 338.
- Ahringer, J., and Kimble, J. (1991). Control of the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites by the *fem-3* 3' untranslated regions. *Nature* **349**: 346 — 348.
- Chekulaeva, M., Hentze, M. W., and Ephrussi, A. (2006). Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* **124**: 521 — 533.
- Evdokimova, V. M., Wei, C.-L., Sitikov, A. S., Simonenko, P. N., Lazarev, O. A., Vasilenko, K. S., Ustinov, V. A., Hershey, J. W. B., and Ovchinnikov, L. P. (1995). The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J. Biol. Chem.* **270**: 3186 — 3192.
- Godefroy-Colburn, T., and Thach, R. E. (1981). The role of mRNA competition in regulating translation. *J. Biol. Chem.* **256**: 11762 — 11773.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**: 853 — 858.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**: 858 — 862.
- Lee, R. C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**: 862 — 864.
- Lodish, H. F., and Jacobsen, M. (1972). Regulation of hemoglobin synthesis: Equal rates of translation and termination of α - and

β -globin chains. *J. Biol. Chem.* **247**: 3622—3629.

Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Struct. Mol. Biol.* **13**: 1108—1114.

Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Standart, N., and Thiele, B.J. (1994). Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J.* **13**: 1476—1481.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science* **309**: 1573—1576.

Schafer, M., Nayernia, K., Engel, W., and Schafer, U. (1995). Translational control in spermatogenesis. *Dev. Biol.* **172**: 344—352.

Sommerville, J., and Ladomery, M. (1996). Masking of mRNA by Y-box proteins. *FASEB J.* **10**: 435—443.

Standart, N., Dale, M., Stewart, E., and Hunt, T. (1990). Maternal mRNA from clam oocytes can be specifically unmasked in vitro by antisense RNA complementary to the 3'-untranslated region. *Genes Dev.* **4**: 2157—2168.

Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**: 1931—1934.

Обзоры

Спирин, А.С. (1996). Регуляция трансляции мРНК-связывающими факторами у высших эукариот. *Успехи биологической химии* **36**: 3—48.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281—297.

Baulcombe, D. (2002). An RNA microcosm. *Science* **297**: 2002—2003.

Lodish, H.F. (1976). Translational control of protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 30—72.

Proud, C.G. (1992). Protein phosphorylation in translational control. *Curr. Top. Cell. Reg.* **32**: 243—369.

Rhoads, R.E., Joshi-Barve, S., and Rinker-Schaffer, C. (1993). Mechanism of action and regulation of protein synthesis initiation factor 4E: Effects on mRNA discrimination, cellular growth rate, and oncogenesis. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **46**: 183—219.

Richter, J.D. (2007). CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 279—285.

Richter, J.D. (2008). Think you know how miRNAs work? Think again. *Nature Struct. Mol. Biol.* **15**: 334—336.

Ruvkun, G. (2001). Glimpses of a tiny RNA world. *Science* **294**: 797—799.

Spirin, A.S. (1966). On «masked» forms of messenger RNA in early embryogenesis and in other differentiating systems. *Curr. Top. Develop. Biol.* **1**: 1—38.

Spirin, A.S. (1969). Informosomes. *Eur. J. Biochem.* **10**: 20—35.

Spirin, A.S. (1994). Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? *Mol. Reprod. Develop.* **38**: 107—117.

Spirin, A.S. (1996). Masked and translatable messenger ribonucleoproteins in higher eukaryotes. In: *Translational Control* (eds. Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., and Sonenberg, N.), pp. 319—334. CSHL Press: New York.

Walden, W.E., Godefroy-Colburn, T., and Thach, R.E. (1981). The role of mRNA competition in regulating translation. I. Demonstration of competition *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **256**: 11739—11746.

Walker, J., Dale, M., and Standart, N. (1996). Unmasking mRNA in clam oocytes: Role of phosphorylation of a 3' UTR masking element-binding protein at fertilization. *Dev. Biol.* **173**: 292—305.

Сборники

Ilan, J., ed. (1987). *Translational Regulation of Gene Expression*. Plenum Press, New York—London.

Ilan, J., ed. (1993). *Translational Regulation of Gene Expression 2*. Plenum Press, New York—London.

Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., and Sonenberg, N., eds. (1996). *Translational*

Control. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B., eds. (2007). *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., eds. (2000). *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Trachsel, H., ed. (1991). *Translation in Eukaryotes*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor.

КОТРАНСЛЯЦИОННОЕ СВОРАЧИВАНИЕ И ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ

17.1. Вклад рибосомы в сворачивание белков

Судьба синтезированного полипептида после терминации трансляции определяется, как правило, заранее, еще в процессе его синтеза (элонгации) — после появления N-концевой части растущей полипептидной цепи на поверхности рибосомы или по ее выходе из внутририбосомного туннеля (см. далее). Синтезированный полипептид следует по одному из трех возможных путей: 1) котрансляционное сворачивание и последующее освобождение компактной глобулы свернутого функционального белка в цитоплазму (цитозоль); 2) взаимодействие недосвернутого полипептида с молекулярными шаперонами (см. далее) с последующим освобождением для дальнейшего формирования четвертичной структуры, транспорта в органеллы и т. д.; 3) прохождение растущей полипептидной цепи из рибосомы непосредственно в мембрану или через мембрану, т. е. *котрансляционная трансмембранная транслокация*. Ниже рассматриваются эти пути и вклад рибосомы в их реализацию.

17.1.1. Стартовая конформация в пептидилтрансферном центре

В соответствии с требованием стереоспецифичности каталитического центра рибосомы — ПТЦ — два аминокислотных остатка, донорный и акцепторный, должны быть расположены в рибосомном ПТЦ строго определенным, стандартным для всех аминокислот образом по отношению друг к другу (см. подразд. 10.3). Наиболее вероятная стандартная взаимная ориентация остатков в ПТЦ соответствует α -спиральной конформации полипептидного остова и, следовательно, после транспептидации конформация С-концевого дипептида должна иметь параметры α -спиральной геометрии для всех возможных пар аминокислот (Лим и Спирын, 1986). Это значит, что по мере добавления новых аминокислотных остатков на С-конец сворачивание растущей цепи происходит начиная с определенной *стартовой конформации*, а отнюдь не с неупорядоченного состояния цепи. Таким образом, котрансляционное сворачивание белка на рибосоме должно происходить как перестройка стартовой — α -спиральной — конформации С-концевого участка растущего полипептида, выходящего из ПТЦ.

17.1.2. Котрансляционное сворачивание растущего полипептида на рибосоме

Полипептидная цепь, находясь на рибосоме, последовательно удлиняется в направлении от N-конца к С-концу. В процессе роста С-конец ковалентно закреплен в рибосомном пептидилтрансферном центре (ПТЦ), тогда как N-конец свободен. Очевидно, что свободный N-концевой участок растущей поли-

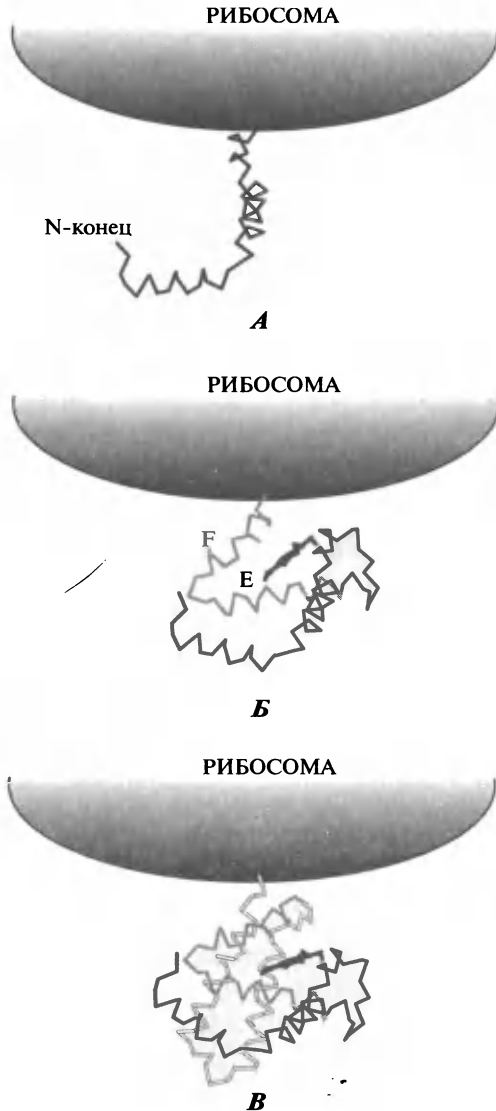


Рис. 17.1. Схематическое изображение котрансляционного сворачивания глобина и котрансляционного связывания гема. Полипептидная цепь принимает конформацию, свойственную зрелому глобулярному белку, в ходе синтеза на рибосоме. Формирование конформации происходит по мере наращивания полипептидной цепи, начиная с N-конца и продолжаясь по направлению к C-концу.

A: начальный этап синтеза полипептидной цепи — свесившаяся с рибосомы N-концевая часть полипептидной цепи формирует N-проксимальные α -спиральные участки, которые потом войдут в структуру полноразмерного белка.

B: в результате дальнейшего роста полипептидной цепи, образования срединных α -спиралей и их взаимодействия начинает формироваться третичная структура белка, обеспечивающая надлежащее взаиморасположение α -спиралей E и F, необходимое для связывания специфического лиганда — молекулы гема.

B: дальнейшее наращивание полипептидной цепи ведет к окончательному формированию глобулы белка на рибосоме.

Komar et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10646—10651

пептидной цепи должен принимать какую-то конформацию. Следовательно, сворачивание полипептидной цепи должно происходить уже в процессе синтеза белка на рибосоме, начиная с N-конца и продолжая по направлению к C-концу по мере роста цепи (*котрансляционное сворачивание*) (рис. 17.1 и рис. 17.1 цв. вкл.).

В ряде случаев было экспериментально показано, что растущий полипептид, прикрепленный к рибосоме, т. е. еще до своего освобождения, может приобретать ферментативную активность, характерную для завершеного белка с уже сформированной третичной структурой. Давно известный пример — синтез β -галактозидазы. Для проявления ферментативной активности этого белка необходимо, помимо сворачивания полипептидной цепи в соответствующую третичную структуру, еще и формирование тетрамерной четвертичной структуры. Оказалось, что растущая цепь перед завершением синтеза, оставаясь еще прикрепленной к рибосоме, способна связываться со свободными субъединицами этого белка, и такой закрепленный на рибосоме комплекс проявляет β -галактозидазную активность (Хамлин и Забин, 1972). В более поздних работах было продемонстрировано, что люцифераза американского светлячка — мультидоменный фермент, состоящий из единственной полипептидной цепи, — успешно сворачивается в правильную третичную структуру с ферментативной активностью в процессе своего синтеза на рибосоме, т. е. котрансляционно (Колб и др., 1994). Важно отметить, что правильное и эффективное котрансляционное сворачивание даже такого крупного мультидоменного белка не требует участия молекулярных шаперонов (см. далее). Также котрансляционное сворачивание белка было показано и подробно изучено для рибосомного синтеза α -глобина. Здесь процесс сворачивания сопровождается приобретением способности растущей цепи глобина специфически связывать его лиганд, гемин. Известно, что связывание гемина зависит от наличия двух должным образом уложенных α -спиралей, E и F. В экспериментах способность связанного с рибосомой растущего пептида связывать гемин появлялась непосредственно после добавления 12 аминокислот, формирующих участок α -спирали F (см. рис. 17.1 и рис. 17.1 цв. вкл.). Таким образом, эти опыты показали, что образование α -спирали F и ее должное расположение относительно предыдущей α -спирали E, т. е. формирование третичной укладки, происходит в непосредственной близости от ПТЦ. Последнее обстоятельство свидетельствовало о том, что в данном случае растущий полипептид свешивается из ПТЦ рибосомы непосредственно в окружающее рибосому пространство, где он может правильно свернуться и связать лиганд.

Сравнивая котрансляционное сворачивание белка и сворачивание свободного, развернутого в цепь полипептида (ренатурацию белка), можно утверждать, что рибосома вносит существенный вклад в эффективность процесса сворачивания. Так, в рассмотренном ранее случае светлячковой люциферазы сворачивание развернутого (денатурированного) белка протекает крайне медленно (много часов), сопровождается агрегацией и дает низкий выход активного продукта; лишь присутствие специальных белков — молекулярных шаперонов — улучшает ситуацию. В тех же условиях котрансляционное сворачивание цепи происходит со скоростью ее синтеза (за минуты), без агрегации, с выходом активного продукта, близким к 100 %, и без шаперонов. Основной вклад рибосомы в эффективное формирование правильной конформации белка при котрансляционном сворачивании полипептидной цепи на рибосоме состоит, по-ви-

димому, в том, что сворачивание растущего полипептида происходит не путем случайного перебора конформаций на различных участках полноразмерной полипептидной цепи, как при ренатурации *in vitro*, а осуществляется последовательно, начиная с N-концевой части. Другими словами, рибосома упорядочивает процесс, задавая определенную направленность сворачивания вдоль полипептидной цепи — от N-конца к С-концу. Кроме того, рибосома задает и определенную универсальную стартовую конформацию растущей полипептидной цепи (α -спираль), так что сворачивание белка на рибосоме начинается не из состояния беспорядочного клубка, как при ренатурации в растворе, а происходит, скорее всего, путем упорядоченной перестройки данной стартовой конформации.

17.1.3. Туннель внутри рибосомы или желоб на ее поверхности для растущего полипептида?

Существуют многочисленные, хотя и косвенные, свидетельства о том, что полипептидная цепь в процессе своего синтеза может не сразу свешиваться с ПТЦ рибосомы в среду, а попадает сначала в специальный туннель внутри рибосомы (внутри ее большой субъединицы) или в желоб (канал) на поверхности рибосомы и свешивается с рибосомы в окружающую среду лишь на выпуклой, обращенной от малой субъединицы, стороне. В соответствии с моделью внутририбосомного туннеля участок полипептидной цепи длиной по крайней мере 30—40 аминокислотных остатков, начиная от ПТЦ, т.е. С-концевой участок растущего полипептида, должен быть защищен рибосомой в этом туннеле и не экспонирован в среде. В таком случае наиболее предпочтительной конформацией растущего полипептида в рибосоме является α -спираль (Лим и Спири́н, 1986). Во-первых, эта конформация, установленная в ПТЦ, должна быть стабилизирована на некотором протяжении цепи благодаря закреплению С-конца. Во-вторых, в ограниченном пространстве внутририбосомного туннеля, имеющего размеры, сравнимые с размерами статистического сегмента полипептидной цепи, она должна быть энтропийно стабилизирована и далее. В-третьих, эта конформация достаточно жесткая, что и требуется для проталкивания растущего пептида сквозь рибосому. В-четвертых, α -спиральная конформация наиболее насыщена водородными связями и, следовательно, является наименее «липкой» структурой полипептида, что также важно для его прохождения через внутририбосомный туннель. В-пятых, α -спиральную конформацию может принять любая аминокислотная последовательность, т.е. она универсальна (см. также подразд. 10.2).

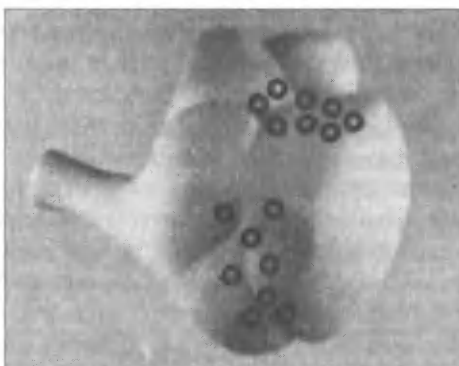
Концепция внутририбосомного туннеля для растущего пептида возникла давно и была основана главным образом на том факте, что в препаратах рибосом С-концевая последовательность растущего пептида длиной 30—40 аминокислотных остатков защищена от действия внешних протеиназ (Малкин и Рич, 1967). В ходе последующих структурных исследований была обнаружена туннелеподобная область с низкой электронной плотностью внутри большой рибосомной субъединицы. Эти данные подкрепляли предположение о возможном размещении растущего полипептида во внутририбосомном туннеле. Чтобы спрятать в себя участок полипептида длиной 30—40 аминокислотных остатков, такой туннель должен иметь длину около 50 Å в случае, если растущий полипептид указанной выше длины имеет α -спиральную конформацию, и более 100 Å для полипептида

в вытянутой конформации. По данным ряда электронно-микроскопических и рентгеноструктурных исследований большой рибосомной субъединицы, узкий туннель, начинающийся в районе ПТЦ, выходит на поверхность рибосомы с противоположной стороны субъединицы, на ее выпуклую внешнюю сторону, обращенную от малой субъединицы, и тогда его длина должна быть около 100 Å (такой туннель может вмещать в себя почти 70 аминокислотных остатков в α -спиральной или не менее 30 остатков в вытянутой конформациях).

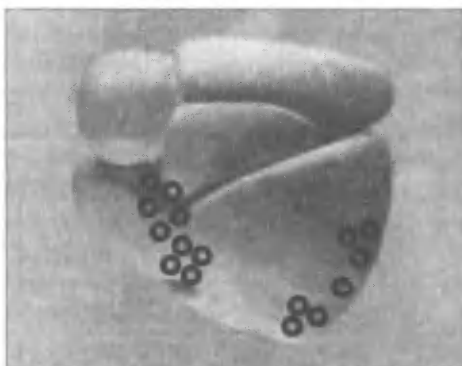
Однако были и другие данные, которые противоречили модели внутририбосомного туннеля указанной выше длины. Так, по некоторым сообщениям, два других фермента — бактериальная деформилаза и аминопептидаза млекопитающих — атакуют растущую полипептидную цепь на расстоянии всего 15—20 аминокислотных остатков от ПТЦ, а не 30—40, как в случае протеиназ. Более того, было показано, что 46 кДа протеаза, превращающая протромбин в тромбин (так называемый фактор *Xa*, т.е. «активированный десятый фактор» каскада свертывания крови), разрезает растущий пептид, связанный с рибосомой, по 12-му аминокислотному остатку, считая от ПТЦ. Эти наблюдения указывали на то, что внутририбосомный туннель, если он существует, должен быть значительно короче, чем допускалось на основании ранее упомянутых результатов. Было выдвинуто альтернативное объяснение экспериментальных данных по защите растущего полипептида рибосомами от ферментативной атаки: растущий пептид, выходя из ПТЦ, проходит не через внутририбосомный туннель, а по каналу или желобу на поверхности рибосомы, и в таком случае различные участки на пути полипептида могут оказаться доступными для атаки различных ферментов.

Подтверждением идеи поверхностного канала или желоба для растущего полипептида на рибосоме стало открытие у эукариот цитоплазматического «комплекса, ассоциированного с растущим пептидом» (NAC, *Nascent peptide-Associated Complex*) (Видманн и др., 1995). Комплекс NAC в эукариотических клетках состоит из двух белков — α (молекулярная масса 33 кДа) и β (21 кДа), которые связываются с пептидсинтезирующей рибосомой и С-концевым участком растущей цепи. В свете этого открытия именно NAC, а не рибосома, мог бы быть ответственным за защиту С-концевого участка растущей цепи, соседствующего с ПТЦ, от протеиназ. Результаты некоторых исследований, посвященных котрансляционному сворачиванию белков, показали, что С-концевая часть растущего пептида, включая аминокислотные остатки, непосредственно соседствующие с ПТЦ, может вовлекаться в процесс формирования третичной структуры синтезируемого белка (см. подразд. 17.1.2 и рис. 17.1, рис. 17.1 цв. вкл.). Эти факты также противоречили концепции узкого туннеля для растущего пептида внутри тела рибосомы, куда не мог бы поместиться свернутый белок. В то же время формирование третичной структуры на С-концевом участке растущего полипептида вряд ли может быть совместимо с удержанием NAC на этом участке и потому должно рассматриваться, по-видимому, как основной конкурирующий фактор, приводящий к диссоциации NAC от сворачиваемого участка растущей цепи.

Использование электронной микроскопии в сочетании с антителами — так называемой иммуноэлектронной микроскопии — дало довольно неожиданный результат: антитела выявляли на рибосоме два различных, удаленных друг от друга, места выхода меченного гаптенем N-конца растущего пептида на рибосомную поверхность — одно во впадине между центральным выступом и боковым L1-выступом большой рибосомной субъединицы, т.е. в непосредственной близости от ПТЦ, а другое на выпуклой задней (обращенной от малой субъединицы) стороне



A



B

Рис. 17.2. Локализация мест выхода полипептидной цепи белка на морфологической модели рибосомы по данным иммуноэлектронной микроскопии.

A: вид рибосомы с внешней, обращенной в среду (неконтактирующей), стороны большой рибосомной субъединицы.

B: боковая проекция рибосомы, вид со стороны L1-выступа.

N-концевой аминокислотный остаток растущего полипептида был помечен динитрофенильной группой в качестве гаптена. Места, где были визуализированы контакты с антителами против гаптена, отмечены кружками.

Ryabova et al. (1988) *FEBS Letters* **226**: 256—260

большой субъединицы, в том самом месте, где предполагался выход внутририбосомного канала (рис. 17.2). Остается неясным, как попадает на заднюю сторону большой рибосомной субъединицы N-конец полипептида — через внутририбосомный туннель или через желоб на поверхности рибосомы.

Гипотезой, примиряющей различные модели выхода растущей полипептидной цепи из рибосомы и места ее котрансляционного сворачивания, является допущение, что в различных ситуациях может реализовываться та или иная альтернатива. Для большинства растворимых глобулярных белков, предназначенных для цитоплазмы, где происходит их синтез, реализуется, возможно, механизм котрансляционного сворачивания непосредственно вблизи ПТЦ, между центральным и боковым выступами. В случаях, когда с растущими цепями на рибосоме взаимодействуют молекулярные шапероны (см. подразд. 17.1.4), возможно удержание недосвернутых цепей на поверхности или в желобе на большой субъединице. Весьма вероятно, что если внутририбосомный туннель используется для прохождения растущего полипептида, то лишь в случаях котрансляционного трансмембранного транспорта (см. подразд. 17.2), — когда котрансляционное и посттрансляционное сворачивание происходит уже в мембране или по ту сторону мембраны.

17.1.4. Молекулярные шапероны, взаимодействующие с растущей полипептидной цепью на рибосоме

Молекулярные шапероны — это специальные белки, взаимодействующие, как правило, с открытыми гидрофобными участками других белков и тем самым предотвращающие агрегацию последних в растворе и поддерживающие их в недосвернутом или частично развернутом состоянии. Оба эффекта снижают кине-

Шапероны и шаперонины

Прокариоты	Эукариоты
Система Hsp70/DnaK шаперонов	
DnaK 70 кДа DnaJ 40 кДа GrpE 23 кДа	Hsp70 Hsp40
Шаперониновая система	
Gro EL (60 кДа) ₁₄ Gro ES (10 кДа) ₇	TRiC (55 кДа) ₁₆

тический барьер процесса сворачивания глобулярных белков, сопровождающегося формированием компактного гидрофобного ядра, и поэтому шапероны способствуют ренатурации денатурированных белков *in vitro* и, возможно, в стрессовых условиях (например, при тепловом шоке) *in vivo*. Действительно, в стрессовых условиях содержание многих белков-шаперонов в клетках сильно возрастает, так что они часто квалифицируются как «белки теплового шока» (*Heat Shock Proteins*, Hsp). Некоторые шапероны могут взаимодействовать с растущими недосвернутыми полипептидными цепями на рибосомах. В соответствии с вышеизложенным считается, что основная функция молекулярных шаперонов состоит в поддержании полипептидных цепей в состоянии, компетентном к сворачиванию в глобулу.

Показано, что у эукариот растущие полипептидные цепи, связанные с рибосомой, могут быть ассоциированы с двумя белками теплового шока, Hsp70 и Hsp40, известными как молекулярные шапероны. В клетках прокариот аналогами и гомологами этих белков являются DnaK (70 кДа) и DnaJ (40 кДа), вместе с которыми обычно присутствует и небольшой белок GrpE (23 кДа) (табл. 17.1). Далее, уже вне рибосомы, некоторые синтезируемые полипептиды могут взаимодействовать с крупными гетероолигомерными кольцевыми комплексами, обеспечивающими окончательное сворачивание освободившихся полипептидных цепей; эти

белковые структуры называются шаперонинами — TriC у эукариот и комплекс GroEL•GroES у прокариот (см табл. 17.1), их связывание с недосвернутыми или денатурированными белками и освобождение свернутых белков сопряжено со связыванием и гидролизом АТФ. Схематическая модель взаимодействия шаперонов и шаперонинов с растущей полипептидной цепью на рибосоме представлена на рис. 17.3. Согласно модели, связывание растущей полипептидной цепи с Hsp70 и Hsp40 происходит, как только за прилегающим к ПТЦ участком связывания NAC (который шапероном не считается), т. е.

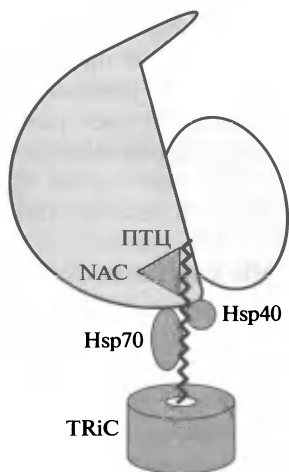


Рис. 17.3. Схематическое изображение вероятного комплекса транслирующей эукариотической рибосомы с шаперонами.

Wiedmann et al. (1994) *Nature* 370: 434–440. Hartl (1996) *Nature* 381: 571–580

после первых ≈ 12 аминокислотных остатков (см. подразд. 17.1.3), появляется часть растущей полипептидной цепи длиной около 50 аминокислотных остатков. Предполагается, что после дополнительных 100 — 150 шагов элонгации полипептидная цепь, свисающая с рибосомы, может быть захвачена комплексом TriC (или GroEL•GroES у прокариот), и в результате этого формируется переходный комплекс, включающий в себя все вышеупомянутые белки, т.е. растущую полипептидную цепь, связанную с рибосомой, Hsp70, Hsp40 и TRiC (см. рис. 17.3). После терминации трансляции переходный комплекс распадается, но полипептидная цепь может еще оставаться в комплексе с TRiC, в котором она принимает окончательную укладку глобулярного белка, и затем освобождается. Эта модель допускает также, что в случаях крупных мультидоменных белков каждый домен может сворачиваться в процессе трансляции, поочередно вступая в комплекс с TriC; максимальный размер котрансляционно сворачиваемого домена в комплексе с TriC должен составлять около 100 аминокислотных остатков.

17.1.5. Синтез белков мембраносвязанными рибосомами

Обе модели, рассмотренные в предыдущих подразделах, — спонтанное, шаперон-независимое сворачивание растущей полипептидной цепи на поверхности рибосомы (см. подразд. 17.1.2) и шаперон-опосредованное сворачивание белка (см. подразд. 17.1.4) — могут рассматриваться лишь в применении к белкам, синтезируемым в цитоплазме на так называемых *свободных полирибосомах*, т.е. на полирибосомах, не ассоциированных с какими бы то ни было клеточными мембранами. Однако как в прокариотических, так и в эукариотических клетках значительная часть рибосом, организованных в полирибосомы, закреплена на мембранах. У прокариот рибосомы могут находиться на внутренней стороне клеточной плазматической мембраны, тогда как у эукариот рибосомы, связанные с мембранами, расположены в основном на шероховатом эндоплазматическом ретикулуме в цитоплазме (см. гл. 4, рис. 4.2 и 4.5). Рибосомы, в частности эукариотические рибосомы, прикрепляются к мембране своей большой (60S) субъединицей. Эукариотическая 60S субъединица имеет специальный участок со средством к мембране эндоплазматического ретикулума, и, по-видимому, все рибосомы прикрепляются к мембране через этот участок в одной и той же ориентации. Согласно данным электронной микроскопии, в такой ориентации ось, соединяющая большую и малую субъединицы, и длинная ось малой субъединицы приблизительно параллельны поверхности мембраны (Анвин, 1979; Кристенсен, 1994). Указанные наблюдения дают основания заключить, что закрепление рибосомы на мембране происходит со стороны выхода межсубъединичного канала, т.е. со стороны бокового L1-выступа большой субъединицы и боковой лопасти («платформы») малой субъединицы (см. морфологию рибосомы в гл. 5). Участок входа мРНК и аминоацил-тРНК в межсубъединичный канал рибосомы и L7/L12-стержень большой субъединицы при такой ориентации оказываются на противоположной стороне. Схематическое изображение полирибосомы, связанной с мембраной, приведено на рис. 17.4.

Было давно замечено, что свободные полирибосомы эукариот синтезируют главным образом водорастворимые глобулярные белки для внутреннего использования в цитоплазме клетки, а связанные с мембраной частицы синтезируют либо белки, встраивающиеся в мембрану, либо секреторные белки, которые через



Просвет эндоплазматического ретикулума

Рис. 17.4. Схематическое изображение мембраносвязанной эукариотической полирибосомы

мембраны транспортируются во внеклеточное пространство. Как целый ряд априорных соображений, так и многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что растущая полипептидная цепь попадает из рибосомы, сидящей на мембране, непосредственно в мембрану и что это прохождение в мембрану (трансмембранный транспорт) осуществляется котрансляционно. Растворимые цитоплазматические белки, синтезируемые свободными полирибосомами, принимают свою глобулярную структуру в водной среде и соответственно характеризуются гидрофильной поверхностью и гидрофобным ядром. При синтезе белка на рибосомах, связанных с мембранами, растущий полипептид может либо проходить сквозь мембрану и по другую сторону от нее тоже оказываться в водной среде, либо входить в контакт с гидрофобной средой двойного липидного слоя мембраны. В случае белков, предназначенных быть компонентами данной мембраны (мембраны эндоплазматического ретикулума у эукариот или плазматической мембраны у прокариот), гидрофобное окружение определяет способ их сворачивания, так что многочисленные гидрофобные остатки экспонируются на поверхности молекулы. Трансмембранные гидрофобные последовательности таких белков обычно существуют в α -спиральной конформации.

В случае белков, транспортирующихся через мембрану, ситуация представляется более сложной. Так, у эукариот растущая полипептидная цепь, проходящая через мембрану, претерпевает окончательное сворачивание в водной среде просвета эндоплазматического ретикулума. Трансмембранная транслокация этих полипептидов сопровождается их многостадийным сворачиванием, которое у эукариот сопряжено с котрансляционными ковалентными модификациями (см. подразд. 17.4).

Представляется вероятным, что модель узкого внутририбосомного туннеля (см. подразд. 17.1.3) может реализоваться именно в случаях котрансляционного трансмембранного транспорта полипептидной цепи, синтезируемой мембраносвязанными рибосомами. Для такого предположения существуют по крайней мере два веских основания. Во-первых, как уже указывалось ранее, по ряду соображений α -спираль должна быть наиболее предпочтительной конформацией полипептида во внутририбосомном туннеле и та же конформация предпочтительна для трансмембранного участка полипептида, так что непосредственный переход растущего полипептида из рибосомы в мембрану может быть естественен и не связан ни с какими структурными перестройками. Во-вторых, путем электронной микроскопии было показано, что узкий туннель внутри большой рибосомной субъеди-

ницы, идущий от ПТЦ с ее внешней выпуклой стороне, открывается напротив места прикрепления рибосомы к мембране и даже соосен с пептидпроводящим каналом транслокона мембраны (см. подразд. 17.2).

17.2. Взаимодействие транслирующих рибосом с мембранами

17.2.1. Ранние наблюдения

Идея о том, что синтез белка на рибосомах, связанных с мембранами, сопряжен с трансмембранной транслокацией белков, возникла после выявления тесной ассоциации («заякоривания») растущих полипептидных цепей с мембранами шероховатого эндоплазматического ретикулаума (Сабатини и Блобель, 1970) и плазматическими мембранами бактерий (Дейвис и др., 1978). Было показано, что транслирующие рибосомы прочно прикреплены к мембране именно своим растущим пептидом, хотя определенное сродство к мембране известно и для не-транслирующих рибосом, а также рибосом, только что начавших синтез белка и содержащих короткий пептид. На основе этих наблюдений было сделано предположение, что мембраны, в частности мембраны шероховатого эндоплазматического ретикулаума, содержат специальные *рецепторы*, которые ответственны за обратимую ассоциацию рибосом с мембраной. Также постулировалось, что эти рецепторы способствуют встраиванию в мембрану связанных с рибосомой растущих полипептидов и формированию мембранных «пор» (или внутримембранных туннелей) для прохождения растущей полипептидной цепи. Реальный сценарий взаимодействия транслирующей рибосомы с мембраной оказался значительно сложнее.

17.2.2. Первичные взаимодействия растущего пептида

Как отмечалось ранее, в эукариотических клетках первым цитоплазматическим фактором, который взаимодействует с участком связанной с рибосомой растущей полипептидной цепи, покинувшим ПТЦ, является белковый комплекс NAC (рис. 17.5, **A**). Было показано, что NAC покрывает не только C-концевой участок растущего полипептида, но и участок рибосомы, характеризующийся высоким сродством к специальному рецептору в мембране эндоплазматического ретикулаума. Поэтому рибосома, несущая растущую полипептидную цепь, не способна связаться с мембраной до тех пор, пока NAC находится на рибосоме. По мере удлинения полипептида NAC может быть вытеснен из рибосомы 11S рибонуклеопротеидным комплексом — сигналузнающей частицей (*Signal Recognition Particle*), или SRP (см. подразд. 17.2.4 и рис. 17.5, **B**). SRP избирательно связывается с растущими цепями, содержащими так называемую *сигнальную последовательность* (см. подразд. 17.2.3), в результате чего рибосомы становятся способными связываться с мембраной и помещать растущий полипептид в пептидпроводящий канал мембраны (рис. 17.5, **B**). Полирибосомы, синтезирующие полипептидные цепи без сигнальных последовательностей, не могут прикрепиться к мембране, а образуемые ими полипептиды сворачиваются и остаются в цитоплазме. Таким образом, связывание транслирующей рибосомы, несущей растущую полипептид-

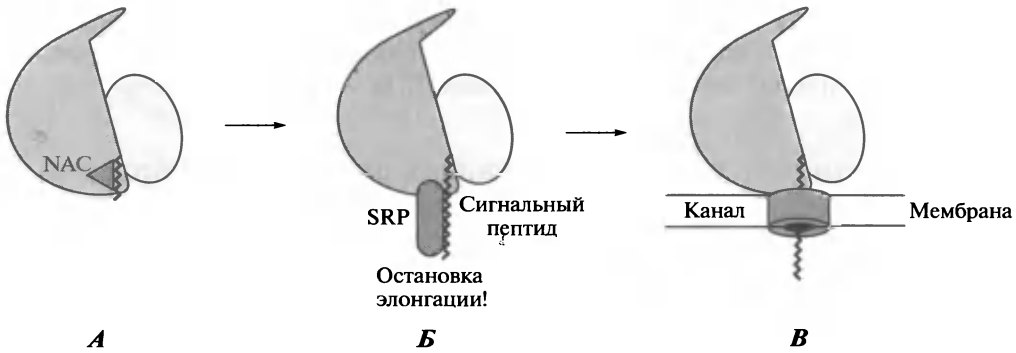


Рис. 17.5. Схема последовательности событий и роли сигналузующей частицы (SRP) в процессе котрансляционного связывания рибосомы, несущей растущую полипептидную цепь, с мембраной эндоплазматического ретикулума.

A: NAC связывается на рибосоме с растущей пептидной цепью вскоре после ее выхода из пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосомы. В отсутствие сигнальной последовательности NAC препятствует вхождению растущего пептида в мембрану, блокируя мембраносвязывающий участок рибосомы.

B: в присутствии сигнальной последовательности SRP прочно связывается с рибосомой и конкурирует с NAC, вытесняя его из связи с растущим пептидом и рибосомой.

V: когда сигналузующая частица (SRP) связана с сигнальной последовательностью растущего пептида, транслирующая рибосома приобретает способность связываться с мембраной эндоплазматического ретикулума и направлять цепь растущего пептида в трансмембранный пептидпроводящий канал.

Powers and Walter (1996) *Curr. Biol.* 6: 331–338

ную цепь, с поверхностью эндоплазматического ретикулума предопределяется взаимодействием синтезируемого полипептида с мембраной, и этот процесс на начальных стадиях контролируется NAC и SRP.

17.2.3. Сигнальные аминокислотные последовательности

В 1971 г. Блобель и Сабатини предположили, что мРНК, которые должны транслироваться мембраносвязанными рибосомами, сразу после инициаторного кодона содержат специальную нуклеотидную последовательность. Эта нуклеотидная последовательность кодирует характерную N-концевую последовательность синтезируемого полипептида, которая служит сигналом для его узнавания либо непосредственно мембраной, либо фактором, опосредующим ассоциацию рибосомы с мембраной. Таким образом, если рибосома транслирует мРНК, кодирующую секреторный или мембранный белок, через некоторое время после инициации трансляции N-концевая часть растущего полипептида свешивается из рибосомы и сигнализирует о необходимости прикрепления рибосомы к мембране. Если N-конец растущего пептида не несет такой сигнальной последовательности, как в случае водорастворимых цитоплазматических белков, то соответствующие рибосомы (полирибосомы) остаются свободными на протяжении всего периода элонгации (см. обзор: Blobel, G., 1980).

Вслед за формулированием этой гипотезы появились экспериментальные свидетельства существования специальных N-концевых последовательностей, обогащенных гидрофобными аминокислотами, в новосинтезированных полипептидных цепях некоторых секреторных эукариотических белков. Первым примером

стала трансляция мРНК, кодирующей легкую цепь иммуноглобулина, в бесклеточной системе на свободных рибосомах. Синтезируемый полипептид имел дополнительную последовательность на N-конце, отсутствующую в подлинной легкой цепи иммуноглобулина; трансляция той же мРНК в присутствии микросом, содержащих мембраносвязанные рибосомы, приводила к синтезу нормального продукта, без дополнительной последовательности (Милстейн и др., 1972). На основании этих результатов был сделан вывод о том, что трансляция первых кодонов мРНК приводит к синтезу N-концевой сигнальной последовательности, которая определяет возможность прикрепления рибосомы к мембране; в процессе дальнейшей элонгации эта последовательность отщепляется на мембране, и конечный продукт трансляции ее не содержит.

Растущие цепи ряда бактериальных белков, встраивающихся во внутреннюю (плазматическую) мембрану или экспортирующихся из цитоплазмы, также характеризуются дополнительными N-концевыми последовательностями. У грамотрицательных бактерий экспорт белков происходит как в периплазматическое пространство (например, щелочная фосфатаза, мальтозо- и арабинозосвязывающие белки, пенициллиназа), так и во внешнюю мембрану (например, липопроteid внешней мембраны и λ -рецептор). После начала синтеза белков, предназначенных для встраивания в мембрану, их гидрофобные N-концевые последовательности взаимодействуют с внутренней цитоплазматической мембраной бактериальной клетки, так что дальнейший их синтез осуществляется уже на рибосомах, связанных с мембраной. Однако синтез бактериальных белков, предназначенных для экспорта через мембрану, как правило, происходит на свободных (не прикрепленных к мембране) рибосомах; после окончания синтеза и терминации трансляции белки в недосвернутой конформации подхватываются шаперонами и в комплексе с ними взаимодействуют с плазматической мембраной. Далее они проходят сквозь мембрану в развернутом состоянии, входят в периплазматическое пространство и затем, в зависимости от гидрофобности или гидрофильности их поверхности, либо остаются в периплазматическом пространстве как растворимые белки, либо встраиваются во внешнюю мембрану. Все это очень напоминает ситуацию с секретруемыми белками в эукариотических клетках, но здесь трансмембранный транспорт происходит посттрансляционно (см. подразд. 17.5).

Итак, было показано, что многие эукариотические секреторные белки синтезируются с дополнительной N-концевой последовательностью, которая затем отрезается на мембране во время синтеза белка. При трансляции соответствующих мРНК в бесклеточных системах в отсутствие мембран формируются удлиненные продукты, называемые пребелками (*pre-proteins*). Если после завершения синтеза белка или даже на поздних стадиях элонгации в систему добавить мембраны (микросомная фракция), то отщепления N-концевых сигнальных последовательностей обычно не происходит. Только если мембраны присутствуют в системе с самого начала (или добавлены вскоре после выхода N-концевого участка растущего полипептида из рибосомы), рибосомы прикрепляются к мембране, растущий пептид входит в нее, и происходит отрезание сигнальной последовательности. Удлинение полипептида сверх определенного размера в водной среде, очевидно, сопровождается его сворачиванием, в результате которого гидрофобный N-концевой участок становится скрытым и его взаимодействие с мембраной невозможным.

Длина сигнальных последовательностей на N-конце растущей полипептидной цепи обычно составляет от 15 до 30 аминокислотных остатков. В них можно раз-

личить три участка, расположенных в следующем порядке: короткий участок h на самом N-конце, в большинстве случаев положительно заряженный; гидрофобный участок h в середине сигнальной последовательности; консервативный участок c , предшествующий участку разрезания. Участок h , состоящий в основном из остатков Leu, Ala, Ile, Phe и Trp, имеет длину 10 ± 3 аминокислоты. В этом отношении он отличается от трансмембранных аминокислотных последовательностей (24 ± 2 остатка) и от гидрофобных последовательностей внутренних районов глобулярных белков (6—8 остатков). Основные свойства участка h — его полная гидрофобность и α -спиральная конформация. Аминокислотный состав участка c подчиняется так называемому «правилу $-1, -3$ », в соответствии с которым положение -1 , обозначающее место разрезания цепи, должно быть занято одним из нижеперечисленных аминокислотных остатков: Ala, Ser, Gly, Cys, Thr, Gln, а в положении -3 не должно находиться ароматических (Phe, His, Tyr, Trp), заряженных (Asp, Glu, Arg, Lys) или крупных гидрофильных (Asn, Gln) остатков. Кроме того, в положениях от -3 до $+1$ не должно быть остатков пролина. Очевидно, указанные строгие универсальные ограничения аминокислотного состава связаны с тем, что сигнальные последовательности множества полипептидных цепей, вовлеченные в котрансляционный импорт белков в эндоплазматический ретикулум, отщепляются одной и той же сигнальной пептидазой.

Хотя сигнальные последовательности не гомологичны друг другу и различаются размерами, у них есть основное общее свойство — способность проводить в эндоплазматический ретикулум любые, даже чужеродные генно-инженерные белки, если они оказываются на N-конце полипептидной цепи.

Некоторые интегральные мембранные белки имеют в своем составе сигнальные последовательности, не отщепляемые сигнальной пептидазой. Такие последовательности состоят из 20—30 (обычно 23 ± 3) гидрофобных и неполярных остатков, и со стороны N-конца им часто предшествует группа положительно заряженных остатков. Белки с подобными неотщепляемыми сигналами котрансляционно импортируются в эндоплазматический ретикулум с участием SRP, SRP-рецептора и того же самого аппарата транслокации (см. далее), как и в случае белков с отщепляемыми сигнальными последовательностями. Однако в данном случае протеолитического расщепления растущей цепи не происходит, прежде всего в связи с отсутствием участка разрезания, удовлетворяющего «правилу $-1, -3$ », и завершённая полипептидная цепь не покидает мембрану.

Общая схема процесса прикрепления транслирующей рибосомы с растущей полипептидной цепью к мембране эндоплазматического ретикулума приведена на рис. 17.5. Если растущий полипептид содержит сигнальную последовательность, рибосома с растущей цепью взаимодействует с SRP в цитоплазме. Образующийся комплекс, в котором элонгация синтезируемого пептида запрещена присутствием SRP (см. подразд. 12.2.4), мигрирует в цитоплазме до тех пор, пока не найдет специфический рецептор (SRP-рецептор), обозначаемый SR, на поверхности эндоплазматического ретикулума. Взаимодействие с SR приводит к освобождению рибосомы с растущей полипептидной цепью из комплекса с SRP и внедрению растущей цепи в трансмембранный транслокационный канал (см. рис. 17.5, **B**). Начиная с этого момента трансляция восстанавливается, и полипептидная цепь продолжает удлиняться, входя через трансмембранный канал в просвет эндоплазматического ретикулума. Затем сигнальная последовательность либо отщепляется специфической эндопептидазой (сигнальной пептидазой), либо встраивается в мембрану эндоплазматического ретикулума. В первом случае завершён-

ная полипептидная цепь, сопряженная с процессом ее ковалентных модификаций (см. подразд. 17.4), сворачивается в глобулу и идет по пути экзоцитоза как растворимый белок. Второй случай (неотщепляемая сигнальная последовательность) характерен для белков, входящих в состав мембраны эндоплазматического ретикула, а также бактериальной плазматической мембраны.

17.2.4. Взаимодействие транслирующей рибосомы, содержащей растущую цепь, с SRP

Как уже указывалось ранее, у эукариот в процессе трансляции, после первых 35—40 элонгационных циклов, растущие полипептидные цепи на рибосомах, вне зависимости от того, содержат ли они сигнальную последовательность или нет, взаимодействуют с белковым комплексом NAC. В случае полипептидов без сигнальной последовательности комплекс NAC, по-видимому, вытесняется при ко-трансляционном формировании третичной структуры. В растущих цепях с сигнальными последовательностями после 60—70 шагов элонгации NAC вытесняется сигналузнающей частью (SRP) (Пауэр и Вальгер, 1996). В связывание с SRP вовлечены как сигнальная последовательность, так и рибосома. Связывание рибосомы с SRP приводит к остановке элонгации (см. подразд. 12.2.4).

У эукариот SRP представляет собой стержневидную рибонуклеопротеидную частицу, ширина которой составляет 5—6 нм, длина — 23—24 нм (11S РНП). Она включает одну молекулу 7S РНК и шесть белковых субъединиц с молекулярными массами от 9 до 72 кДа, обозначаемых соответственно SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 и SRP72. Четыре из них образуют два гетеродимера — SRP9/14, расположенный на участке 7S РНК вблизи концов полинуклеотидной цепи, и SRP68/72 в центральной части частицы, тогда как две оставшиеся субъединицы — SRP19 и SRP54 — существуют в виде мономеров, сидящих на смежных спиралях РНК на другом конце частицы (рис. 17.6). 7S РНК, образующая структурный остов SRP, четко подразделяется на два основных функциональных домена — так называемые Alu-подобный домен и S-домен. При присоединении к рибосоме домен S контактирует с большой рибосомной субъединицей в месте выхода сигнального пептида и связывается с сигнальной последовательностью, тогда как домен Alu достигает факторсвязывающего участка большой субъединицы и, по-видимому, ответствен за остановку трансляции (Франк, Бекманн и др., 2004). Модель чет-

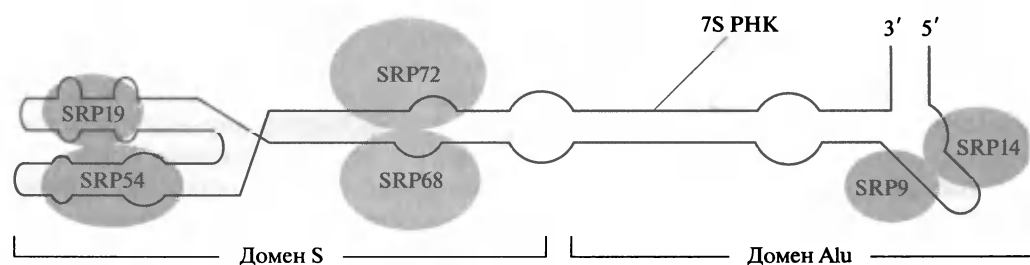


Рис. 17.6. Схема строения (четвертичной структуры) эукариотической сигналузнающей частицы (SRP).

Указаны два домена цепи 7S РНК — Alu и S — и шесть белковых субъединиц, составляющих эту 11S рибонуклеопротеидную частицу.

Maity and Weeks (2007) *J. Mol. Biol.* **369**: 512—524

вертикальной структуры SRP, вторичных и третичных структур структур ее компонентов, включая 7S РНК и четыре белка, по два на противоположных концах палочкообразной частицы, выведенная из данных рентгеноструктурного анализа, представлена на рис. 17. II цв. вкл.

Субъединица-мономер с молекулярной массой 54 кДа (SRP54), ассоциированная с S-доменом, является, по-видимому, функционально наиболее важной. Прежде всего, именно SRP54 непосредственно связывается с растущим полипептидом через его сигнальную последовательность. Эта белковая субъединица складывается из трех структурных доменов: N-концевого домена (SRP54N), представляющего собой пучок из четырех α -спиралей; серединного домена, содержащего ГДФ/ГТФ-связывающий и ГТФазный центр (SRP54G), и C-концевого сигнальсвязывающего α -спирального домена (SRP54M). C-концевой домен (SRP54M), взаимодействующий с сигнальной последовательностью, включает в себя три α -спирали, обогащенные остатками метионина. Предполагается, что эти спирали формируют пептидсвязывающий желоб на поверхности SRP54M, и метиониновые остатки, которые по гибкости своих боковых групп уникальны среди гидрофобных аминокислот, обеспечивают возможность взаимодействия с множеством сигнальных последовательностей, различных по составу и структуре. Субъединица SRP54 прикреплена к S-домену 7S РНК тоже через свой C-концевой домен M, который имеет специфический РНК-связывающий участок. Серединный домен той же субъединицы SRP (SRP54G) содержит участок связывания ГТФ/ГДФ и ГТФазный центр, которые участвуют в регуляции связывания SRP с SRP-рецептором на мембране эндоплазматического ретикулума (см. далее).

Что касается функций других субъединиц SRP, то димер SRP68/72, расположенный в центральной части SRP и тоже связанный с S-доменом 7S РНК, каким-то образом опосредует встраивание растущей цепи в транслокационный аппарат мембраны. Во всяком случае SRP с поврежденными субъединицами SRP68 и SRP72 связываются с транслирующей рибосомой и ее растущей цепью и останавливают элонгацию последней, но не способны обеспечить последующую трансмембранную транслокацию полипептида. Предполагается, что этот эффект обусловлен неспособностью таких дефектных SRP взаимодействовать с рецептором на мембране эндоплазматического ретикулума (см. далее). Димер SRP9/14, расположенный на другом конце удлиненной частицы и связанный с Alu-доменом 7S РНК (см. рис. 17.6), отвечает, как отмечалось выше, за остановку элонгации. Физиологическое значение именно этой функции SRP заключается в том, что присоединение SRP к растущему пептиду, содержащему сигнальную последовательность, предотвращает возможность сворачивания полипептидной цепи по мере ее роста и тем самым маскирования свисающего с рибосомы N-конца, который необходим для инициации транслокации через мембрану эндоплазматического ретикулума. Существование трех районов SRP, отвечающих за три различные функции (узнавание сигнальной последовательности, остановку элонгации и трансмембранную транслокацию), коррелирует с формой этих частиц, видимой в электронный микроскоп.

SRP характерны и для бактериальных клеток, но бактериальные частицы гораздо меньше эукариотических и состоят только из 4,5S РНК, представляющей собой укороченную версию 7S РНК, лишенную Alu-домена, и гомолога SRP54, обозначаемого Ffh или р48. Соответственно комплекс 4,5S RNA•Ffh (бактериальная SRP) способен лишь связывать растущие цепи с сигнальными последова-

тельность на рибосоме, но не может останавливать элонгацию, скорее всего, по причине отсутствия Alu-домена и связывающихся с ним белковых компонентов. Комплекс 4,5S RNA•Ffh служит для поддержания растущих цепей в форме, компетентной к трансмембранной транслокации, и для направления их в плазматическую мембрану. Мембранный белок FtsY является рецептором бактериальной SRP (комплекса 4,5S RNA•Ffh), участвующей в трансмембранной транслокации некоторых бактериальных белков.

17.2.5. Взаимодействие комплекса рибосома/растущая цепь/SRP с рецептором SRP на мембране

Комплекс рибосомы с растущей цепью и SRP в клетках млекопитающих связывается с белковым рецептором SRP, располагающимся на мембране эндоплазматического ретикулума. SRP-рецептор (SR) состоит из двух субъединиц. α -Субъединица — это белок молекулярной массой 69 кДа, и его большая часть обращена в цитоплазму, в то время как N-концевая часть закорена в мембране. Цитоплазматическая часть SR α взаимодействует с SRP и имеет два домена, гомологичных доменам N и G белковой субъединицы SRP54; соответственно, как и сама SRP, SR α содержит участок связывания ГТФ в домене G. В отличие от SRP54, однако, N-концевой участок SR α представляет собой дополнительный домен, богатый заряженными аминокислотами и ответственный за взаимодействие с другой субъединицей SR. Другая субъединица — SR β — представляет собой интегральный мембранный белок с молекулярной массой 30 кДа и тоже содержит ГТФ/ГДФ-связывающий участок и ГТФазный центр. Две субъединицы дополняют друг друга, обеспечивая надежное закрепление гетеродимера SR на мембране.

Во взаимодействие с SRP-рецептором (SR) вовлечены два белковых компонента SRP — SRP54 и гетеродимер SRP68/72. Существуют указания, что с SR α непосредственно связывается SRP54 через G-домен (SRP54G) и оба белка при этом должны быть в комплексе с ГТФ, т.е., по-видимому, находиться в специальной ГТФ-конформации. Роль гетеродимера SRP68/72 может заключаться в стабилизации должной конформации SRP; во всяком случае дефекты в гетеродимере приводят к нарушениям встраивания растущей цепи в мембрану эндоплазматического ретикулума.

Взаимоотношения между рибосомой с растущей цепью, SRP и SR регулируются связыванием ГТФ и его гидролизом в ГТФазных центрах этих трех компонентов. Как показано на рис. 17.7, свободные SRP содержат ГДФ. Замена ГДФ на ГТФ в SRP54G индуцируется, по-видимому, присоединением SRP к транслирующей рибосоме. SRP с субъединицей SRP54G в ГТФ-индуцированной конформации находит SR на мембране эндоплазматического ретикулума и связывается с его субъединицей SR α . Взаимодействие SRP с SR α вызывает гидролиз ГТФ — по-видимому, в обоих компонентах комплекса, в результате чего SRP54G и SR α переходят в «расслабленную» (*relaxed*) ГДФ-конформацию, теряют средство друг к другу и комплекс диссоциирует. SRP с субъединицей SRP54G в «релаксированной» ГДФ-конформации покидает рибосому и мембрану, а рибосома со свисавшим с нее полипептидом оказывается захваченной другой мембранной структурой — *транслокационным*, или *пептидпроводящим, каналом*, иногда также называемым *транслоконом*. Когда рибосома с полипептидной цепью

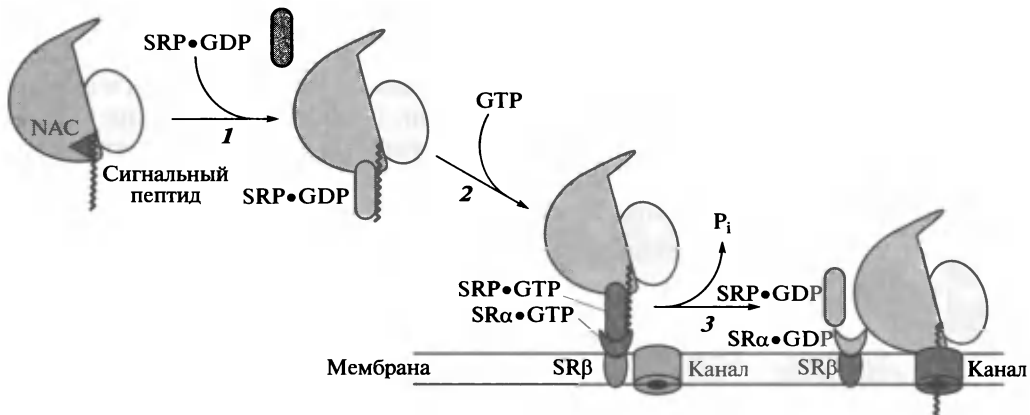


Рис. 17.7. Схема последовательности событий в процессе инициации котрансляционной трансмембранной транслокации растущего полипептида.

- 1:** комплекс рибосомы, несущей растущий пептид, с NAC взаимодействует с ГДФ-формой сигнализующей частицы (SRP), в результате чего NAC вытесняется из рибосомы.
- 2:** замещение ГДФ на ГТФ в SRP сопровождается связывание SRP в ГТФ-форме с мембранным SRP-рецептором (SR), тоже в ГТФ-форме.
- 3:** взаимодействие SRP с SRP-рецептором индуцирует гидролиз ГТФ, в результате чего SRP в ГДФ-форме диссоциирует от рибосомы и SRP-рецептора, а рибосома с растущим пептидом садится на торец пептидпроводящего канала мембраны.

Corsi and Schekman (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 30299—30302

освобождается от SRP и взаимодействует с мембраной эндоплазматического ретикулума, возобновляется элонгация и растущая цепь проникает в транслокационный канал.

Оценивая в целом роль ГТФ в процессах связывания сидящей на рибосоме полипептидной цепи с мембраной и инициации ее трансмембранной транслокации, следует обратить внимание на очевидную аналогию с EF1- и EF2-катализируемыми шагами элонгационного цикла (см. подразд. 9.2 и 11.2). Как и в случаях EF1 и EF2, связывание молекулы ГТФ, по-видимому, стабилизирует определенную жесткую (фиксированную) конформацию SRP54G, SRα и SRβ, обеспечивая их высокое сродство друг к другу, а гидролиз ГТФ «отпускает» эту конформацию (см. рис. 9.4), позволяя компонентам диссоциировать и затем вступать в новый цикл. Аналогично EF1-катализируемому связыванию аминоксил-тРНК и EF2-катализируемой внутририбосомной транслокации пептидил-тРНК, SRP с ГТФ катализирует связывание рибосомы и растущего на ней полипептида с мембранным компонентом, а затем SR с ГТФ как-то участвует в их переносе на транслокон, иницируя трансмембранную транслокацию; гидролиз ГТФ с полезной работой не сопряжен и необходим лишь для освобождения SRP и SR. Интересно, что посадка рибосомы с сигнальным пептидом на транслокон мембраны и дальнейшая трансмембранная транслокация растущего полипептида могут происходить и без участия SRP и SR, что напоминает бесфакторную, или «неэнзиматическую», трансляцию (см. подразд. 11.3 и рис. 11.5). Следовательно, вышеописанный процесс присоединения рибосомы с полипептидной цепью к транслокону термодинамически спонтанен, а SRP и SR должны рассматриваться, по-видимому, как ГТФ-зависимые катализаторы процесса. (Действительно, мутанты дрожжей, лишенные SRP и его рецептора, в принципе могут жить и даже расти, но медленно.)

17.3. Котрансляционная трансмембранная транслокация растущих полипептидных цепей

17.3.1. Трансмембранный пептидпроводящий канал

Идея существования трансмембранного канала (или туннеля), через который котрансляционно транспортируется (транслоцируется) растущая полипептидная цепь, была прямым выводом из гипотезы сигнальной последовательности (Блобель и Добберштейн, 1975). С тех пор было поставлено множество экспериментов и получены прямые свидетельства в пользу этой модели. Более того, в эукариотических и прокариотических клетках был идентифицирован эволюционно консервативный белковый комплекс, функционирующий в качестве трансмембранного белокпроводящего канала (*Protein-Conducting Channel*, PCC) (см. обзоры: Rapoport, T. A., et al., 1996; Corsi, A. K., and Schekman, R., 1996; Martoglio, B., and Dobberstein, B., 1996; Wickner, W., and Schekman, R., 2005). Этот комплекс был визуализирован с помощью криоэлектронной микроскопии (Бекманн и др., 1997, 2001; Брайтон и др., 2002), выделен, закристаллизован, и его атомная структура определена методом рентгеноструктурного анализа (Раппопорт и др., 2004). Согласно всем имеющимся данным, принципиальная структура белокпроводящего канала универсальна для клеток эукариот, эубактерий и архей.

Транслокационный канал в мембране образуется гетеротримерным белковым комплексом, обозначаемым SecE1p у эукариот или SecY у эубактерий и архей. Его основным функциональным ядром является α субъединица (SecE1 α или SecY α) молекулярной массой около 40 кДа, с которой ассоциированы две небольшие вспомогательные субъединицы — β (14 кДа) и γ (8 кДа).

SecE1 α или SecY α — это трансмембранный белок, полипептидная цепь которого пересекает мембрану 10 раз, образуя 10 трансмембранно расположенных α -спиральных участков, собранных в цилиндр или «бочонок» высотой около 45 Å и диаметром до 100 Å.

Спирали 1—5 и спирали 6—10 образуют соответственно две компактные половинки («створки») молекулы белка, соединенные неспирализованным участком цепи (шарнирной петлей) между спиралью 5 и 6; каждая половинка состоит из двух внутренних и трех внешних спиралей (см. рис. 17.III цв. вкл. и рис. 17.8). По другую от шарнира сторону цилиндра («бочонка») крайние спирали половинок несколько разнесены, и эта открытая сторона белка оказывается непосредственно обращенной в липидный слой мембраны («латеральные ворота» и «TM2/7-разъем» на рис. 17.8 и 17.9 соответственно). Трансмембранный канал для котрансляционного прохода полипептидной цепи целиком формируется между половинками субъединицы SecE1 α или SecY α , а малые субъединицы β и γ занимают периферическое положение со стороны, противоположной разъему, обращенному в липидный слой.

Строение канала таково, что на цитоплазматической стороне мембраны образуется воронка диаметром 20—25 Å, служащая в качестве входа для полипептидной цепи. Воронка сужается до минимального отверстия в середине трансмембранного пути, а затем снова расширяется, так что канал по форме напоминает песочные часы.

В самом узком месте располагается «пробка», перекрывающая канал и разделяющая его на две части — цитоплазматическую и внешнюю по отношению

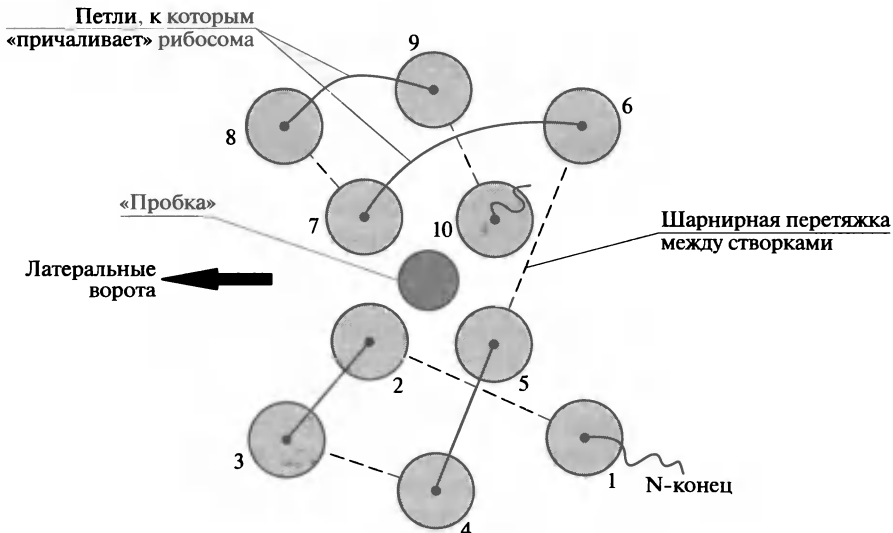


Рис. 17.8. Схема расположения десяти α -спиральных участков трансмембранного белка SecY α или SecE α — основной субъединицы белкового комплекса, образующего пептид-проводящий канал сквозь мембрану эндоплазматического ретикулума; вид с торца канала, обращенного в цитоплазму.

Торцы α -спиралей представлены светло-серыми кружками. Ход полипептидной цепи белка SecY α или SecE α между спиралью показан сплошными линиями, когда цепь идет со стороны цитоплазмы, и пунктирными линиями, когда цепь соединяет спиральные участки со стороны просвета ретикулума. Все спирали по ходу полипептидной цепи пронумерованы цифрами от 1 до 10. Спирали 1—5 образуют одну половину боковой стенки канала, а спирали 6 и 7 — другую, так что канал проходит между двумя «створками», соединенными шарнирной перетяжкой в виде участка полипептидной цепи между спиралью 5 и 6. Напротив перетяжки, между спиралью 2 и 7, располагаются так называемые латеральные ворота для выхода синтезируемых трансмембранных белков или доменов в липидный слой самой мембраны

к цитоплазме, но тоже с водным наполнением. «Пробка» представляет собой небольшую α -спиральку 2а, отделенную от спирали 2 гибкой перемычкой и способную выходить из сужения, открывая пору диаметром 5—8 Å в середине канала.

Сужение канала — пора — выстлана по периметру кольцом из семи изолейциновых (иногда с участием валиновых) остатков, которые создают гидрофобную прокладку («сальник») вокруг транслоцирующегося полипептида, препятствующую протеканию цитоплазматических компонентов даже во время транспорта белковой цепи. В то же время воронкообразные расширения канала с обеих сторон обеспечивают водную среду по обе стороны поры и минимум нежелательных взаимодействий (прилипания) полипептида со стенками канала. Сама пора эластична, и при ее небольших деформациях позволяет проходить полипептиду в α -спиральной конформации даже с массивными аминокислотными остатками типа триптофана, гистидина, тирозина и т.п. Однако пора определенно запрещает прохождение свернутых белковых доменов.

Экспериментальные данные показывают, что пора канала открывается в ответ на связывание сигнальной последовательности полипептида. При транслокации полипептида, представляющего собой секреторный белок, полипептид вставляется в канал в виде петли так, что сигнальная последовательность оказывается в

стенке канала, а следующий за ним участок цепи — в водной среде самого канала. При этом гидрофобный участок сигнальной последовательности образует α -спираль, которая взаимодействует со спиралью 2 и 7 стенки канала и с липидным слоем мембраны.

Указанные выше взаимодействия дестабилизируют связь «пробки» (спиральки 2а) с порой, и «пробка» отходит. Поступление в открытую пору участка полипептидной цепи за сигнальной последовательностью фиксирует канал в открытом состоянии, не позволяя «пробке» вернуться на место и заткнуть пору. «Пробка» может вернуться и закрыть пору только после того, как полипептидная цепь покинет канал.

При транслокации полипептида, представляющего собой белок, встроенный в мембрану, гидрофобные трансмембранные спирали растущего полипептида могут выходить из канала латерально через разъем между двумя половинками Sec61 α непосредственно в липидную фазу мембраны. Это — так называемые *латеральные ворота* канала (см. подразд. 17.3.3).

17.3.2. Транспорт растущего полипептида через трансмембранный канал

Исходя из структуры пептидпроводящего канала, определенной с помощью рентгеноструктурного анализа, а также всей совокупности имеющихся экспериментальных данных о функционировании канала, был предложен следующий сценарий котрансляционной трансмембранной транслокации растущего полипептида, предназначенного быть растворимым секреторным белком (рис. 17.9).

1. Транслокационный канал целиком формируется лишь одной копией трансмембранного белкового комплекса Sec61p (у эукариот) или SecY (у прокариот) и проходит между двумя половинками («створками») его большой субъединицы — Sec61 α или SecY α соответственно. Каждая половинка включает пять трансмембранных α -спиралей (1—5 и 6—10). Исходно трансмембранный канал закрыт, так как небольшая спираль, подвижно сочлененная с α -спиралью 2, ассоциирована с порой в средней узкой части канала, играя роль «пробки», или «затычки».

2. С цитоплазматическим входом канала — петлями, соединяющими спирали 6 и 7 и спирали 8 и 9, — а также С-концевым «хвостом» взаимодействует транслирующая рибосома, несущая полипептид с сигнальной последовательностью. Это взаимодействие индуцирует конформационное изменение α -субъединицы канала, приводящее к дестабилизации закрытого состояния канала, но еще не к полному его открыванию.

3. N-концевой положительно заряженный сегмент сигнальной последовательности заякоривается на отрицательно заряженной цитоплазматической поверхности мембраны, а ее гидрофобная часть погружается (интеркалируется) в стенку канала между спиралью 2 и 7 (т.е. фактически уже входит в латеральные ворота). Это приводит к некоторому раздвиганию половинок субъединицы Sec61 α (или SecY α) в районе между спиралью 2 и 7, что окончательно открывает канал, и петля постсигнальной части полипептида вставляется в пору.

4. Сигнальная часть полипептида отрывается сигнальной пептидазой, и полипептид по мере его синтеза продвигается через канал к просвету эндоплазматического ретикулума или внешней стороне мембраны. Гидрофобное кольцо («сальник») поры вокруг полипептидной цепи не дает другим молекулам проходить

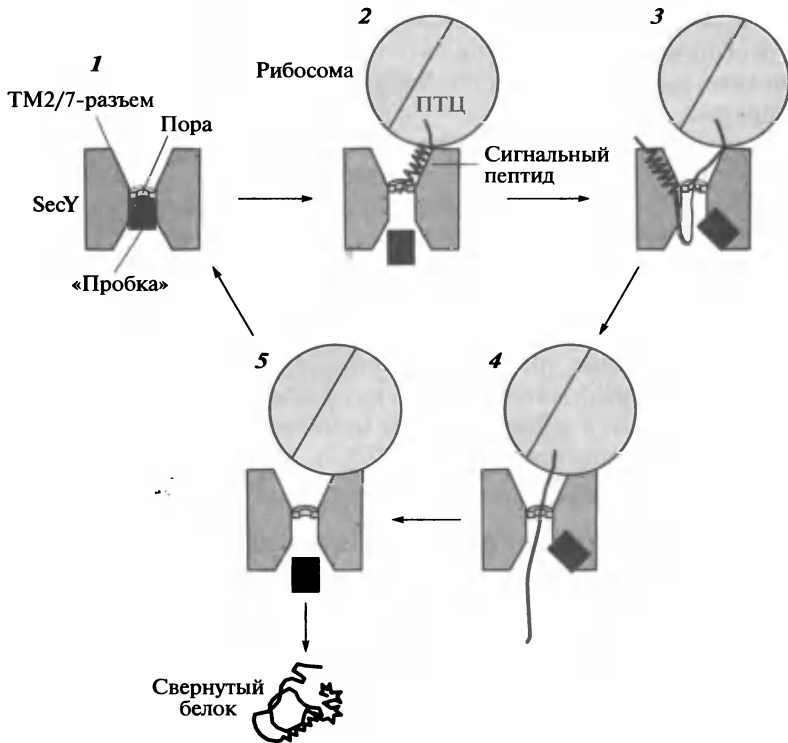


Рис. 17.9. Стадии котрансляционной трансмембранной транслокации секреторного белка.

- 1:** трансмембранный канал закрыт — его пора блокирована «пробкой» (короткой α -спиралью 2а).
- 2:** взаимодействие с рибосомой, несущей растущий пептид с сигнальной последовательностью, дестабилизирует закрытую конформацию канала — пора приоткрывается.
- 3:** гидрофобная часть сигнальной последовательности интеркалируется между спиральями 2 и 7 (см. рис. 17.8), створки канала раздвигаются, пора открывается полностью, и постгидрофобный участок растущего пептида петлей проходит в пору.
- 4:** сигнальный пептид отщепляется протеазой от растущей полипептидной цепи, которая «проваливается» в открытый канал.
- 5:** после котрансляционного прохождения всей полипептидной цепи через канал и терминации трансляции полипептид в виде котрансляционно свернутого белка освобождается в просвет эндоплазматического ретикулума.

См. van den Berg et al. (2004) *Nature* 427: 36—44

через пору и канал в процессе продвижения полипептида из водной среды цитоплазмы в водную среду просвета или внешней стороны мембраны.

5. Терминация трансляции приводит к освобождению полипептида в просвет ретикулума (или на внешнюю сторону мембраны) и к его сворачиванию в глобулярный белок. На самом деле сворачивание может начинаться и прогрессивно происходить в направлении С-конца уже в процессе трансляции и трансмембранной транслокации, когда N-концевая часть полипептида попадает в расширение канала и далее в просвет ретикулума или наружу от мембраны, и завершается при терминции. Однако участие шаперонов, подхватывающих транслоцируемый полипептид по прохождении поры, может задержать процесс сворачивания, предохраняя полипептид от агрегации и других нежелательных взаимодействий.

17.3.3. Встраивание растущей полипептидной цепи в мембрану

Полипептидные цепи, несущие неотщепляемые N-концевые сигнальные последовательности (см. подразд. 17.2.3) или внутренние участки со сгруппированными гидрофобными и неполярными аминокислотными остатками, после терминации трансляции обычно остаются так или иначе связанными с мембраной эндоплазматического ретикулама эукариот или плазматической мембраной прокариот. В случае N-концевой неотщепляемой сигнальной последовательности с положительно заряженным N-концом последний фиксируется на цитоплазматической стороне мембраны, а остальная часть полипептида, как описано ранее — петлей (см. рис. 17.9), вставляется в пептидпроводящий канал мембраны. Затем неотщепляемая сигнальная последовательность в форме α -спирали выходит из канала в липидный слой мембраны через латеральные ворота канала (см. подразд. 17.3.1), остальная часть пептидной цепи продолжает путь по пептидпроводящему каналу, а после терминации и освобождения из рибосомы проваливается в просвет эндоплазматического ретикулама или наружу от плазматической мембраны. Такие белки оказываются заякоренными в липидном слое мембраны, будучи прикрепленными к ней в просвете ретикулама у эукариот (рис. 17.10, **A**) или с внешней стороны плазматической мембраны бактерий.

Полипептидные цепи с отщепляемой сигнальной последовательностью, но имеющие C-проксимальную неполярную последовательность достаточной длины, сначала проходят пептидпроводящий канал обычным образом, как описано в подразд. 17.3.2 (см. рис. 17.9), но C-проксимальная последовательность, особенно если за неполярным участком следует группа положительно заряженных остатков, застревает в канале в форме α -спирали и может выйти из него лишь через латеральные ворота. В таком случае завершённый белок тоже оказывается по ту сторону мембраны и тоже заякоренным в липидном слое, но своим C-проксимальным участком (рис. 17.10, **B**). В ряде случаев на C-конце может присутствовать часть полипептида, достаточная для формирования цитоплазматического глобулярного домена белка.

Если растущая полипептидная цепь имеет неполярную последовательность необходимой длины вблизи N-конца с предшествующими ей сгруппированными отрицательно заряженными остатками и следующими за ней положительно заряженными остатками, то этот участок также будет остановлен в пептидпроводящем канале за счет взаимодействий своих заряженных аминокислот как с положительно заряженной внешней, так и с отрицательно заряженной внутренней сторонами мембраны. При этом полипептид будет продолжать синтезироваться рибосомой, сидящей на входе в канал, но не продвигаться в канал, а выходить петлей в зазор между каналом и прикрепленной к нему рибосомой. (Следует напомнить, что рибосома прикрепляется только ко второй половине, или «створке», SecE1 α или SecY α — к перемычкам между спиральюми 6 и 7, спиральюми 8 и 9, а также к C-концевому участку, так что между другой половиной канальной субъединицы и рибосомой остается существенный зазор.) В итоге после терминации трансляции и освобождения синтезированного полипептида образуется глобулярный белок, заякоренный своим N-проксимальным α -спиральным участком на цитоплазматической стороне мембраны (см. рис. 17.10, **B**).

Котрансляционное встраивание полипептидных цепей, пересекающих мембрану несколько раз, обычно достигается за счет присутствия повторяющейся

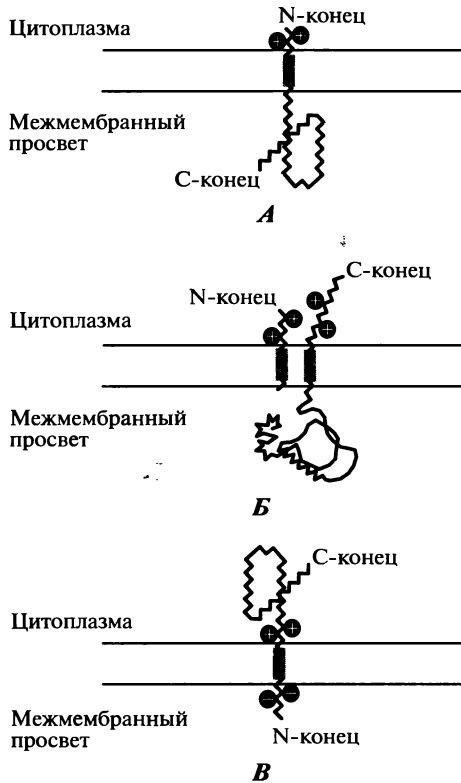


Рис. 17.10. Различные типы фиксации гидрофобных доменов трансмембранных белков в мембране эндоплазматического ретикулума эукариот или плазматической мембране бактерий.

A: белки с неотщепляемым сигнальным пептидом. Положительно заряженный N-конец растущего полипептида остается на цитоплазматической (отрицательно заряженной) стороне мембраны, гидрофобная часть сигнального пептида закоривается в мембране, а остальная часть полипептида «проваливается» в просвет ретикулума или периплазму, формируя там водорастворимый глобулярный домен трансмембранного белка.

B: белки с отщепляемым сигнальным пептидом, но содержащие гидрофобную «якорную» последовательность вблизи C-конца синтезируемого полипептида. После образования петли (см. рис. 17.9, стадия 3) сигнальный пептид отщепляется, и полипептидная цепь растет в просвет ретикулума или в периплазму, пока «якорная» последовательность не остановит его дальнейшего продвижения. Таким образом, основная часть синтезированного полипептида формирует водорастворимый глобулярный домен трансмембранного белка в просвете ретикулума или периплазме, а C-конец (обычно содержащий положительно заряженные аминокислотные остатки) остается на цитоплазматической стороне.

B: белки, содержащие гидрофобную «якорную» последовательность вблизи N-конца синтезируемого полипептида. Отрицательно заряженный N-конец синтезируемого полипептида транслоцируется через канал в просвет ретикулума или в периплазму, но вскоре якорная последовательность останавливает дальнейшую транслокацию полипептидной цепи, и основная ее часть вместе с C-концом остается на цитоплазматической стороне мембраны, формируя водорастворимый глобулярный домен трансмембранного белка в цитоплазме.

См. von Heijne (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 307—333

последовательности из 20 — 30 неполярных аминокислот с группой положительно заряженных аминокислотных остатков со стороны C-конца. Было экспериментально показано, что по мере выхода каждого трансмембранного сегмента такого полярного мембранного белка из рибосомы он поступает в канал (ана-

логично случаю на рис. 17.10, *Б*); при этом предыдущий трансмембранный сегмент в форме α -спирали выходит из канала в липидный слой мембраны через латеральные ворота. Так последовательно строятся трансмембранные белки, цепи которых многократно пересекают мембрану своими α -спиральными участками.

17.4. Котрансляционные ковалентные модификации и сворачивание растущей полипептидной цепи в просвете эндоплазматического ретикулума

Когда растущая, связанная с рибосомой полипептидная цепь проходит через канал и поступает в просвет эндоплазматического ретикулума, она подвергается ковалентным модификациям, включая отщепление сигнальной последовательности (см. обзор: Hagwood, R., 1980), первичное или «сердцевинное» гликозилирование, т. е. навешивание олигосахаридных цепей $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ на остатки аспарагина в мотиве Asn-X-Thr/Ser (см. обзоры: Phelps, C. F., 1980; Hubbard, S. C., and Ivatt, R. J., 1981), и образование внутримолекулярных дисульфидных мостиков (см. обзор: Freedman, R. B., and Hillson, D. A., 1980). Эти типы модификаций характерны практически для всех белков, вовлеченных в экзоцитозный путь, но их функциональное назначение различно. Очевидно, что белки, предназначенные для секреции, не могли бы покинуть мембрану эндоплазматического ретикулума без протеолитической обработки, приводящей к удалению гидрофобного сигнального пептида. Образование дисульфидных мостиков считается необходимым прежде всего для стабилизации белка в целях предотвращения разворачивания белков во время экзоцитоза, которое приводило бы к блокированию экзоцитозного пути. N-гликозилирование, по крайней мере в некоторых случаях, может быть очень важным для правильного сворачивания белков и особенно для их стабилизации.

Что касается протеолитического отщепления сигнального пептида и N-гликозилирования, котрансляционный характер этих процессов обеспечивается расположением соответствующих ферментов — сигнальной пептидазы и гликозилтрансферазного комплекса — на мембране в непосредственной близости от транслокационного канала. В отличие от протеолиза и гликозилирования, образование внутримолекулярных дисульфидных связей катализируется водорастворимым компонентом межмембранного просвета эндоплазматического ретикулума — глобулярным белком дисульфидизомеразой.

Различные типы модификаций растущей полипептидной цепи часто взаимозависимы и тесно сопряжены с процессом сворачивания полипептида, которое, в свою очередь, может быть опосредовано как связанными с мембраной, так и растворимыми шаперонами эндоплазматического ретикулума. Это может быть проиллюстрировано данными по сворачиванию гемагглютинина вируса гриппа (Хелениус и др., 1995). Белок содержит N-концевую отщепляемую сигнальную последовательность и трансмембранный участок (остатки 514—540) вблизи C-конца. Основное «тело» белка, с семью N-пришитыми олигосахаридными группами и шестью внутримолекулярными дисульфидными мостиками, обращено в просвет эндоплазматического ретикулума. Было показано, что гликозилирование остатков Asn165 и Asn286, так же как и образование дисульфидной связи между остатками Cys52 и Cys277, происходит до завершения элонгации полипептидной

цепи. Ингибирование гликозилирования с помощью туникамицина нарушает правильное сворачивание гемагглютинина и вызывает его агрегацию вследствие образования aberrантных межмолекулярных дисульфидных мостиков.

17.5. Альтернативные пути трансмембранного транспорта новосинтезированных белков

Далеко не все новосинтезированные белки и не во всех случаях транспортируются через мембраны путем котрансляционной трансмембранной транслокации (см. обзор: Wickner, W., and Schekman, R., 2005). Такой путь типичен для прохода полипептида в/или сквозь мембрану эндоплазматического ретикулаума животных клеток и других эукариот, а также во внутреннюю (плазматическую) мембрану грамотрицательных бактерий (но не сквозь нее!). Другой путь, о котором упоминалось ранее, — это посттрансляционная трансмембранная транслокация несвернутых белков, удерживаемых в этом состоянии шаперонами и передаваемых ими на транслокон; указанный альтернативный путь типичен для прохождения белков *сквозь* плазматическую мембрану грамотрицательных бактерий. Белки бактерий, предназначенные для транспорта через мембрану, тоже, как и у эукариот, синтезируются в виде пребелков, т. е. несут сигнальную последовательность. После терминации трансляции и освобождения из рибосом в цитоплазме бактерий полноразмерные пребелки удерживаются шаперонами, шаперон SecB далее перехватывает такой новосинтезированный белок и взаимодействует со своим рецептором на мембране, обозначаемым SecA, который передает пребелок на пептидпроводящий канал (транслокон), иницируя трансмембранную транслокацию полипептида. Транслокация проходит в несвернутом состоянии, в направлении от N-конца к C-концу полипептида. В мембране сигнальная последовательность отщепляется сигнальной пептидазой, и полипептид выходит в периплазматическое пространство, сворачиваясь в глобулярный белок (рис. 17.11). Таким образом, в посттрансляционной транслокации у бактерий шаперон SecB и особенно его мембраносвязанный рецептор SecA играют роль пептиднесущей рибосомы. Действительно, SecA связывается с теми же самыми участками на входе в пептидпроводящий канал — в частности, с петлей, соединяющей спирали 8 и 9, и C-концевым «хвостом» α -субъединицы SecY, — что и транслирующая рибосома в случае котрансляционного транспорта растущего полипептида (см. подразд. 17.3.2). Вместо ГТФ, однако, SecA использует связывание АТФ и его гидролиз — сопряженно с циклами своих конформационных изменений. Кроме того, для эффективной посттрансляционной транслокации сквозь мембрану оказывается необходимым мембранный потенциал на плазматической мембране — по-видимому, для полярного продвижения полипептида в отсутствие подачи со стороны транслирующей рибосомы.

Секреция белков наружу из бактериальной клетки может происходить разными путями. Обычно для прохода свернутых глобулярных белков служат довольно крупные транспортные поры. Через специальные секреторные поры во внешней мембране могут выводиться глобулярные белки, предварительно транслоцированные в периплазму, но существуют и мембранные транспортеры, проводящие глобулярные белки через обе мембраны сразу наружу.

В той или иной мере посттрансляционная трансмембранная транслокация присуща и эукариотическим клеткам, в частности грибам (дрожжи); не исключена она

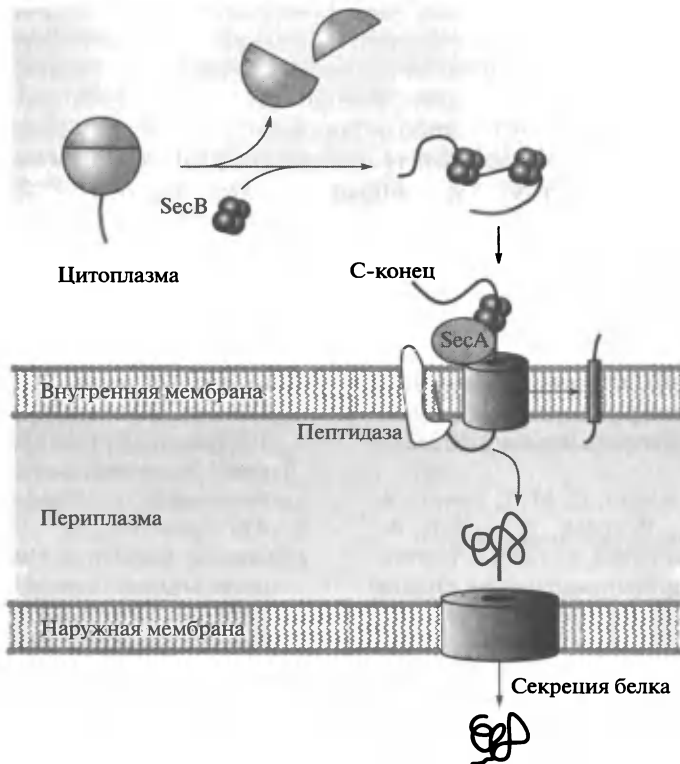


Рис. 17.11. Схема посттрансляционной трансмембранной транслокации полипептидов через пептидпроводящий канал плазматической (внутренней) мембраны грамотрицательных бактерий.

Синтезируемый на рибосоме полипептид удерживается в развернутом или недосвернутом состоянии шаперонами, а после терминации и освобождения из рибосомы перехватывается специальным шапероном SecB. Шаперон SecB со связанным полипептидом присоединяется к своему рецептору на мембране — белку SecA, который взаимодействует с пептидпроводящим каналом SecY. Далее полипептид входит в канал своим N-концом, мембранная пептидаза отщепляет его сигнальную последовательность, и полипептид транслоцируется в периплазму, сворачиваясь там в глобулярный белок. Для белков, секретируемых наружу, существуют специальные секреторные поры во внешней мембране бактериальной клетки.

См. Wickner and Schekman (2005) *Science* **310**: 1452—1456

и у млекопитающих, а также всех других эукариот. В качестве цитоплазматического партнера мембранного белокпроводящего канала для посттрансляционной транслокации у эукариот вместо рибосомы или SecA используется белковый комплекс — тетрамер Sec62/63p, в комбинации с АТФ-зависимым шапероном BiP, встречающим транспортируемый белок у канала на стороне межмембранного пространства.

Системы импорта синтезируемых в цитоплазме белков в органеллы эукариотических клеток представляют собой тоже, как правило, посттрансляционную трансмембранную транслокацию. Так, белки митохондриального матрикса синтезируются в цитозоле в виде пребелков со специальной сигнальной последовательностью, свернутой в α -спиральную палочку. Они связываются с рецепторами на поверхности внешней митохондриальной мембраны, а затем проходят в на-

правления от N-конца к С-концу через транслокационный канал внешней мембраны (обозначаемый ТОМ) в межмембранное пространство. В межмембранном пространстве они связываются с каналом-транслоказой внутренней митохондриальной мембраны (ТИМ), которая проводит их сквозь мембрану в матрикс, где они сворачиваются в глобулы, либо оставляет их в мембране. Как и в случае бактериальной посттрансляционной транслокации, импорт белков из цитозоля в митохондрии зависит от АТФ и мембранного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 17

- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., and Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* **278**: 2123—2126.
- Beckmann, R., Spahn, C. M. T., Eswar, N., Helters, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001). Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* **107**: 361—372.
- Berg, van den B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**: 36—44.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975). Transfer of protein across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes by murine myeloma. *J. Cell Biol.* **67**: 835—851.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T. A., Kühlbrandt, W., and Collinson, I. (2002). Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418**: 662—665.
- Chen, W., Helenius, J., Braakman, I., and Helenius, A. (1995). Co-translational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6229—6233.
- Christensen, A. K. (1994). Negatively-stained polysomes on rough microsome vesicles viewed by electron microscopy: further evidence regarding the orientation of attached ribosomes. *Cell Tissue Res.* **276**: 439—444.
- Corsi, A. K., and Schekman, R. (1996). Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **271**: 30299—30302.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Frank, J., and Beckmann, R. (2004). Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* **427**: 808—814.
- Hamlin, J., & Zabin, I. (1972). β -Galactosidase: Immunological activity of ribosome-bound, growing polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 412—416.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, K., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I. M., White, S. H., and von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature* **433**: 377—381.
- Kolb, V. A., Makeyev, E. V., and Spirin, A. S. (1994). Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J.* **13**: 3631—3637.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K., and Hartl, F. U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**: 683—688.
- Lauring B., Sakai, H., Kreibich, G., and Wiedmann, M. (1995). Nascent polypeptide-associated complex prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5411—5415.
- Lauring, B., Kreibich, G., and Wiedmann, M. (1995). The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9435—9439.

- Lim, V.I., and Spirin, A.S. (1986). Fluorescence analysis of ribosomal transpeptidation conformation of nascent peptide. *J. Mol. Biol.* **188**: 565—577.
- Malkin, L.I., and Rich, A. (1967). Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J. Mol. Biol.* **26**: 329—346.
- Makeyev, E.V., Kolb, V.A., and Spirin, A.S. (1996). Enzymatic activity of the ribosome-bound nascent polypeptide. *FEBS Lett.* **378**: 166—170.
- Milstein, C., Brownlee, G.G., Harrison, T.H., and Mathews, M.B. (1972). A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature New Biol.* **239**: 117—120.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L., Ban, N., and Frank, J. (2005). Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature* **438**: 318—324.
- Powers, T., and Walter, P. (1996). The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. *Curr. Biol.* **6**: 331—338.
- Ryabova, L.A., Selivanova, O.M., Baranov, V.I., Vasiliev, V.D., and Spirin, A.S. (1988). Does the channel for nascent peptide exist inside the ribosome? Immune electron microscopy study. *FEBS Lett.* **226**: 255—260.
- Sabatini, D.D., and Blobel, G. (1970). Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes. *J. Cell Biol.* **45**: 146—157.
- Sabatini, D.D., Tashiro, Y., and Palade, G.E. (1966). On the attachment of ribosomes to microsomal membranes. *J. Mol. Biol.* **19**: 503—524.
- Smith, W.P., Tai, P.-C., and Davis, B.D. (1978). Nascent peptide as sole attachment of polyosomes to membranes in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 814—817.
- Smith, W.P., Tai, P.C., and Davis, B.D. (1978). Interaction of secreted nascent chains with surrounding membrane in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5922—5925.
- Tatu, U., Hammond, C., and Helenius, A. (1995). Folding and oligomerization of influenza hemagglutinin in the ER and the intermediate compartment. *EMBO J.* **14**: 1340—1348.
- Unwin, P.N.T. (1979). Attachment of ribosome crystals to intracellular membranes. *J. Mol. Biol.* **132**: 69—84.
- Wang, S., Sakai, H., and Wiedmann, M. (1995). NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J. Cell Biol.* **130**: 519—528.
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A., and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**: 434—440.
- Монографии, сборники и обзоры
- Лузиков, В.Н. (2006) *Экзоцитоз белков*. ИКЦ «Академкнига», Москва.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1496—1500.
- Blobel, G., and Sabatini, D.D. (1971). Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells. In: *Biomembranes* (ed. Manson, L.A.) **2**: 193—195. Plenum Press: New York, London.
- Ellis, R.J., and van der Vies, S.M. (1991). Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 321—347.
- Freedman, R.B., and Hillson, D.A. (1980). Formation of disulfide bonds. In: *The Enzymology of Post-translational Modifications of Proteins* (eds. Freedman, R.B., and Hawkins, H.C.), vol. **1**, pp. 157—212. Academic Press, London—New York.
- Gething, M.-J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33—45.
- Halic, M., and Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 116—125.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571—580.
- Harwood, R. (1980). Protein transfer across membranes: The role of signal sequences and signal peptidase activity. In: *The En-*

- zymology of Post-translational Modifications of Proteins* (eds. Freedman, R. B., and Hawkins, H. C.) **1**: 3—52. Academic Press, London — New York.
- Hubbard, S. C., and Ivatt, R. J. (1981). Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 555—583.
- Inouye, M. and Halegoua, S. (1980). Secretion and membrane localization of proteins in *Escherichia coli*. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **7**: 339—371.
- Jaenicke, R. (1993). Role of accessory proteins in protein folding. *Curr. Opinion Struct. Biol.* **3**: 104—112.
- Johnson, A. E. (1997). Protein translocation at the ER membrane: a complex process becomes more so. *Trends Cell Biol.* **7**: 90—95.
- Luetcke, H. (1995). Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur. J. Biochem.* **228**: 531—550.
- Luirink, J., & Dobberstein, B. (1994). Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. *Mol. Microbiol.* **11**: 9—13.
- Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1996). Snapshots of membrane-translocating proteins. *Trends Cell Biol.* **6**: 142—147.
- Phelps, C. F. (1980). Glycosylation. In: *The Enzymology of Post-translational Modifications of Proteins* (eds. Freedman, R. B., and Hawkins, H. C.) **1**: 105—155. Academic Press, London — New York.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 271—303.
- Von Heijne, G. (1988). Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 307—333.
- Walter, P., and Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 87—119.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**: 1452—1456.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ПРИНЦИПЫ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ РИБОСОМ**18.1. Основные принципы структуры рибосомы****18.1.1. Подразделение на две неравные субчастицы**

Рибосома — компактная частица, которая в первом приближении может быть аппроксимирована телом сферической формы диаметром от 30 до 35 нм. Однако в ее детальных внешних очертаниях и внутренней структуре не наблюдается ни внешней, ни внутренней симметрии. Наиболее заметным ее свойством является подразделение на *две неэквивалентные асимметричные субчастицы, или рибосомные субъединицы*. Ассоциация между субъединицами лабильна. При уменьшении концентрации Mg^{2+} в среде рибосома диссоциирует на две субъединицы разных размеров: гомогенные рибосомные частицы с коэффициентом седиментации 70S (в случае прокариот) или 80S (в случае эукариот) превращаются в двухкомпонентную смесь 50S и 30S субчастиц или 60S и 40S субчастиц соответственно:



Диссоциацию также можно вызвать высокими концентрациями одновалентных ионов, мочевиной, повышенной температурой и т. п. Диссоциация обратима, и восстановление оптимальных для стабильности рибосомы условий приводит к реассоциации рибосомных субъединиц.

Таким образом, первый характерный принцип структуры рибосомы заключается в том, что она всегда состоит из двух лабильно связанных неравнозначных блоков, называемых большой и малой рибосомными субъединицами. Две рибосомные субъединицы осуществляют в трансляции различные функции, и их нестабильная ассоциация может быть необходима для обеспечения взаимных смещений рибосомных блоков в процессе работы рибосомы.

18.1.2. Самоукладка рибосомной РНК в компактную структуру

Каждая рибосомная субъединица содержит одну высокополимерную молекулу рибосомной РНК, на долю которой приходится от половины до двух третей общей массы субъединицы. В состав большой субъединицы входит цепь рРНК, которая приблизительно в два раза длиннее рРНК малой субъединицы. Длины двух эубактериальных высокополимерных рРНК составляют 3 000 нуклеотидов (23S рРНК) и около 1 500 нуклеотидов (16S рРНК), в то время как в клетках высших животных содержатся рРНК длиной до 4 800 нуклеотидов (28S рРНК) и 1 900 нуклеотидов (18S рРНК) соответственно.

В условиях подавления электростатического отталкивания фосфатных групп (при умеренных концентрациях солей, особенно в присутствии ионов магния) цепи изолированной высокополимерной рРНК сворачиваются в компактные частицы специфической формы. Характерно, что размеры и форма компактно свер-

нутой 23S рРНК подобна размерам и форме полусферической большой рибосомной субъединицы, а 16S рРНК в компактном состоянии напоминает трехдоменную малую рибосомную субъединицу (см. рис. 6.4). В присутствии рибосомных белков наблюдается аналогичная укладка и компактизация. Отсюда можно сделать следующие заключения. Во-первых, каждая из высокополимерных цепей рРНК (большая и малая) обладает способностью *специфическому самосворачиванию* в процессе образования рибосомных частиц в клетке, подобному специфическому самосворачиванию полипептидных цепей в глобулярные белки. Во-вторых, именно специфическая компактная структура рРНК определяет основные морфологические черты соответствующих рибосомных субъединиц.

Физические измерения показывают, что масса рРНК в среднем тяготеет ближе к центру рибосомной частицы, тогда как белки в среднем занимают более периферическое положение. Можно сделать вывод, что компактно свернутая молекула рРНК формирует структурный остов и ядро рибосомной частицы (рибосомной субъединицы). Таким образом, ядро рРНК каждой рибосомной субъединицы определяет ее компактность, ее специфическую форму и специфическое пространственное расположение на ней рибосомных белков.

В дополнение к высокополимерной рРНК, большая субъединица содержит одну или две молекулы рРНК с относительно небольшой молекулярной массой; в случае бактерий это 5S рРНК, а в случае эукариот — 5S и 5,8S рРНК. Малые рРНК сравнимы по размерам с рибосомными белками и вместе с ними размещены на ядре высокополимерной рРНК.

18.1.3. Сборка рибосомных белков на компактной РНК

Каждая рибосомная субъединица содержит множество молекул рибосомных белков, причем все они различны. В этом отношении рибосомные рибонуклеопротеидные частицы принципиально отличаются от вирусных рибонуклеопротеидов, в которых белковая оболочка строится из множества молекул одного и того же белка посредством их симметричного расположения (самосборки) на поверхности РНК. Симметричная упаковка одинаковых элементов не может быть реализована в случае отличающихся друг от друга рибосомных белков. При сборке рибосомных частиц используется другой механизм: каждый рибосомный белок имеет свой собственный участок посадки на рРНК. Белок специфически узнается соответствующей локальной структурой рРНК и присоединяется к ней. Таким образом, различные рибосомные белки занимают свои места на рРНК. В бактериальных рибосомах (*E. coli*) на 23S рРНК расположены 34 различных рибосомных белка, а с 16S рРНК связан 21 белок.

Как уже отмечалось, каждая из двух высокополимерных рРНК формирует сердцевину соответствующей рибосомной субъединицы, и белки расположены в среднем ближе к поверхности частиц. В то же время множество участков рРНК также были обнаружены в районе поверхности. В отличие от вирусных рибонуклеопротеидов рибосомные белки не формируют оболочку вокруг РНК. Во-первых, в рибосомах доля белков значительно меньше, чем в вирусных рибонуклеопротеидах, и количества рибосомных белков в частицах недостаточно для того, чтобы покрыть всю рРНК; рРНК скорее «декорирована» белками. Во-вторых, рибосомные белки не формируют поверхностного слоя, а организованы в группы или трехмерные кластеры, в которых одни белки закрыты другими и, следова-

тельно, не все выставлены на поверхность. В-третьих, периферийные структуры рРНК могут быть вовлечены в образование белковых кластеров и закрывать некоторые белки с поверхности.

Рибосомные белки в рибосомах могут играть двойственную роль. С одной стороны, некоторые из них могут участвовать в функционировании активных центров рибосомы, формируемых в основном структурами рРНК. С другой стороны, рибосомные белки выступают в качестве стабилизаторов или модификаторов некоторых локальных структур рРНК, поддерживая их тем самым в функционально активном состоянии. В частности, основная каталитическая функция рибосомы, ее пептидилтрансферазная активность, обеспечивается главным образом локальными структурами рРНК в составе большой рибосомной субъединицы, но некоторые рибосомные белки могут быть необходимыми для поддержания (стабилизации) активной конформации этих структур.

18.2. Основные принципы функционирования рибосомы

18.2.1. Структурные карманы для функциональных центров

Связывание субстратов и ферментативный катализ на макромолекулах, включая белки и межмолекулярные комплексы, происходит, как правило, в желобах, впадинах или щелях между субъединицами или доменами, т.е. в *структурных карманах*, но не на ровной поверхности молекулы. Принимая во внимание это правило и анализируя морфологические черты рибосомы, а также результаты прямых экспериментов, можно сделать ряд выводов о некоторых деталях структуры рибосомы, касающихся расположения рибосомных функциональных центров.

Наиболее заметная морфологическая характеристика рибосомы, выявляемая с помощью электронной микроскопии, — борозда, разделяющая две рибосомные субъединицы (см. рис. 5.2 и 5.8, **Б**). Эта особенность отражает реальный факт: между двумя субъединицами рибосомы существует зазор или даже щель значительных размеров. Эта щель в определенной точке расширяется: в электронный микроскоп заметен так называемый «глаз» рибосомы, который представляет собой вход в межсубъединичное пространство. Именно межсубъединичная щель вмещает в себя основные субстраты рибосомы, а именно пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК, которые участвуют в реакции транспептидации. Таким образом, *участки связывания тРНК* расположены между двумя рибосомными субъединицами — в межсубъединичном пространстве.

Малая рибосомная субъединица подразделена на головку и тело глубоким желобом (см. рис. 5.5 и 5.6). Именно в желобе малой субъединицы (на ее так называемой «шее») расположен *мРНК-связывающий центр* (см. рис. 8.2 и 8.4). Цепь мРНК протаскивается через этот участок в направлении от 5'- к 3'-концу и прочитывается потриплетно в процессе трансляции.

У большой рибосомной субъединицы также имеется головка: это центральный выступ (центральный протуберанец) среди трех видимых выступов на коронобразной проекции большой субъединицы (см. рис. 5.7). Участок непосредственно под «шеей» заключает в себе основной каталитический центр рибосомы, *пептидилтрансферазный центр*, отвечающий за образование пептидных связей в процессе элонгации.

Две рибосомные субъединицы ассоциируют друг с другом таким образом, что их «шеи» расположены друг напротив друга, в результате чего формируется основное межсубъединичное пространство рибосомы. Вход в пространство со стороны одного из боковых выступов (палочкообразного стержня) виден как «глаз» в соответствующей (неперекрывающейся) проекции рибосомы (см. рис. 5.2, **Б** и 5.8, **Б**). Две субстратные молекулы тРНК, связанные в этом межсубъединичном кармане, должны взаимодействовать на малой субъединице с двумя смежными кодонами мРНК своими антикодонами и одновременно на большой субъединице с пептидилтрансферазным центром, своими акцепторными концами. Таким образом, ориентация двух молекул тРНК относительно субъединиц рибосомы ясно определена: антикодона находятся на «шее» малой субъединицы, тогда как акцепторные концы — в районе под «шеей» большой субъединицы (см. рис. 8.11, 8.12 и 8.14).

Важное характерное свойство рибосомы — наличие на большой субъединице палочкообразного стержня, видимого как боковой выступ справа от головки в перекрывающейся проекции рибосомы (см. рис. 5.8, **А**). Неприкрытая область большой субъединицы в основании стержня служит «посадочной площадкой» для факторов элонгации, и в частности для комплекса EF1 (EF-Tu) с новой аминоксил-тРНК, палочкообразный стержень взаимодействует с EF1 и фиксируется этим взаимодействием, приближаясь к поверхности рибосомы и образуя карман для связанного с рибосомой фактора (см. рис. 8.15, **А**). В таком же кармане, образуемом «посадочной площадкой» в основании стержня, самим стержнем и поверхностью малой субъединицы, связывается и другой фактор элонгации, EF2 (EF-G), взаимодействующий с рибосомой, чтобы катализировать транслокацию.

Другой боковой выступ, расположенный слева от головки (центрального выступа) большой субъединицы, если смотреть с ее контактирующей стороны (см. рис. 5.7, **В**, а также рис. 7.12, *слева*), вместе с прилегающим участком тела большой субъединицы находится у выхода из межсубъединичного пространства (см. рис. 8.1, боковая лопасть) и участвует в освобождении деацилированной тРНК из рибосомы в ходе транслокации.

18.2.2. Разделение функций между рибосомными субъединицами

В процессе биосинтеза белка в рибосому поступает генетическая информация, закодированная в виде последовательности нуклеотидных остатков мРНК; рибосома декодирует ее, катализирует образование пептидных связей в реакциях транспептидации и передвигает мРНК и тРНК. Соответственно существуют три аспекта функционирования рибосомы: 1) рибосома как аппарат декодирования (генетическая функция); 2) рибосома как катализатор (рибозим) пептидилтрансферазной реакции (биохимическая функция); 3) рибосома как молекулярная машина (механическая функция). Декодирующая и каталитическая функции рибосомы четко разделены между двумя рибосомными субъединицами, тогда как механическая функция требует ассоциации двух субъединиц.

18.2.2.1. Генетическая функция малой субъединицы

Трансляция мРНК инициируется малой рибосомной субъединицей. Для того чтобы инициировать трансляцию, рибосома должна сначала диссоциировать на

субъединицы. Именно малая субъединица связывается с мРНК в начале инициации трансляции и таким образом выступает в качестве *первичного акцептора генетической информации* для аппарата синтеза белка. Только на конечных этапах инициации к малой субъединице присоединяется большая, и начинается элонгация полипептида.

В процессе элонгации рибосомы удерживаются на мРНК и двигаются по ее цепи в направлении от 5'-к 3'-концу. Малая рибосомная субъединица в составе целой транслирующей рибосомы полностью ответственна за удержание мРНК в процессе элонгации, в то время как большая субъединица физически не контактирует с мРНК. Следовательно, сканирование кодирующей последовательности мРНК, т.е. считывание генетической информации в процессе элонгации, целиком осуществляется на малой субъединице транслирующей рибосомы.

Механизм потриплетного сканирования мРНК подразумевает, что молекулы мРНК прежде всего взаимодействуют с малой рибосомной субъединицей. А- и Р-участки рибосомы организованы в основном также на малой субъединице, и лишь акцепторные концы тРНК связаны с большой субъединицей. Антикодоны тРНК специфически узнают «свойственные» кодоны мРНК в районе «шеи» малой субъединицы. Кодон-антикодонное взаимодействие поддерживается на всех стадиях элонгационного цикла, и движение остатков тРНК во время транслокации приводит к сдвигу связанной с ними цепи мРНК на один триплет вдоль «шеи» малой субъединицы.

Таким образом, малая рибосомная субъединица в индивидуальном (диссоциированном) состоянии акцептирует генетическую информацию в форме мРНК и инициирует процесс трансляции. Во время трансляции малая субъединица в составе целой рибосомы удерживает мРНК и декодирует ее с использованием тРНК. Так как отмеченные выше операции имеют отношение к генетическому материалу, то можно утверждать, что малая рибосомная субъединица специализируется на исполнении генетических функций рибосомы.

18.2.2.2. Каталитическая функция большой субъединицы

Когда пептидил-тРНК занимает Р-участок, а аминоацил-тРНК связывается в А-участке (см. рис. 8.3), акцепторные концы обеих тРНК с их аминокислотными остатками взаимодействуют с большой рибосомной субъединицей в ее пептидилтрансферазном центре (см. рис. 10.5). Это взаимодействие индуцирует реакцию транспептидации между двумя субстратами, пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК: карбоксильная группа пептидил-тРНК переносится на аминогруппу аминоацил-тРНК (см. рис. 8.5). В результате реакции формируется новая пептидная связь, и синтезируемый пептид удлиняется на один аминокислотный остаток. Таким образом, большая субъединица транслирующей рибосомы выступает в качестве катализатора, ответственного за образование пептидных связей и синтез (элонгацию) полипептидных цепей в целом. Это — основная каталитическая функция рибосомы. Установлено, что пептидилтрансферазный центр является интегральной частью большой субъединицы, а более конкретно — частью одного из доменов (домена V) большой рибосомной РНК (см. рис. 8.7).

Помимо катализа транспептидации, большая рибосомная субъединица участвует в ферментативном гидролизе ГТФ в процессе трансляции. Это участие не является прямым: ферментативные ГТФазные центры размещаются на белковых факторах трансляции (включая факторы элонгации EF1 и EF2, фактор инициа-

ции IF2 и фактор терминации RF3), и именно взаимодействие фактора с факторсвязывающим участком на большой рибосомной субъединице (см. рис. 8.9) активирует ГТФазный центр фактора. Такое совместное действие большой рибосомной субъединицы и факторов трансляции в осуществлении ферментативного гидролиза ГТФ необходимо для обеспечения (катализа) конформационных переходов в транслирующей рибосоме, сопровождающих связывание аминоксил-тРНК и транслокацию пептидил-тРНК.

18.3. Рибосома как молекулярная машина

18.3.1. Определения

Машина — «устройство, выполняющее механические движения для преобразования энергии, материалов и информации» (Артоболевский и Левитский, 1974). Различают следующие виды машин.

1. *Энергетические (энергосиловые) машины, или двигатели*, предназначены для преобразования любого вида энергии (тепловой, химической, электрической) в механическую. К ним относятся паровые поршневые двигатели, двигатели внутреннего сгорания, электродвигатели, реактивные двигатели и т.п. Двигатели внутреннего сгорания и электрические двигатели называют также *моторами*. Кроме того, к двигателям относят устройства, отдающие накопленную механическую энергию, — инерционные, пружинные и гиревые механизмы.

2. *Технологические машины* используются для преобразования материала. Это — разнообразные станки, прокатные станы, упаковочные машины и т.п.

3. *Транспортные машины* осуществляют перемещение предмета или себя относительно предмета. К ним относятся паровозы, пароходы, автомобили, тракторы, танки, тепловозы, электровозы, самолеты, вертолеты, различные детские заводные, электрические и инерционные машинки, подъемники, конвейеры, насосы, вентиляторы и т.п. Для осуществления механических перемещений вышеперечисленные транспортные макромашины должны иметь *двигатель* (мотор) и *движитель* (колесо, весло, винт, гусеница, реактивное сопло и т.д.).

Термин «молекулярная машина» применяется главным образом для обозначения макромолекулярных устройств, участвующих в относительно крупномасштабных перемещениях макромолекул или их комплексов. В ходе таких перемещений обычно используется свободная энергия гидролиза нуклеозидтрифосфатов (АТФ, ГТФ) или, гораздо реже, других экзергонических реакций. В особых случаях, таких как бактериальные жгутики, для движения может использоваться непосредственно трансмембранный ионный потенциал. К молекулярным машинам относят системы полярного транспорта частиц вдоль микротрубочек (тубулин — кинезин и тубулин — динеин) и микрофиламентов (актин — миозин) внутри клетки; двигательные системы жгутиков и ресничек эукариотических клеток; мышечное сокращение, основанное на перемещении миозина вдоль актиновых филаментов; трансмембранные АТФ-синтазы, ионные насосы и другие трансмембранные переносчики; транслирующие рибосомы, ДНК- и РНК-полимеразные ферментные комплексы. Таким образом, термин «молекулярная машина» может быть определен как *молекулярное устройство (макромолекулярный комплекс), способное трансформировать химическую или электро-*

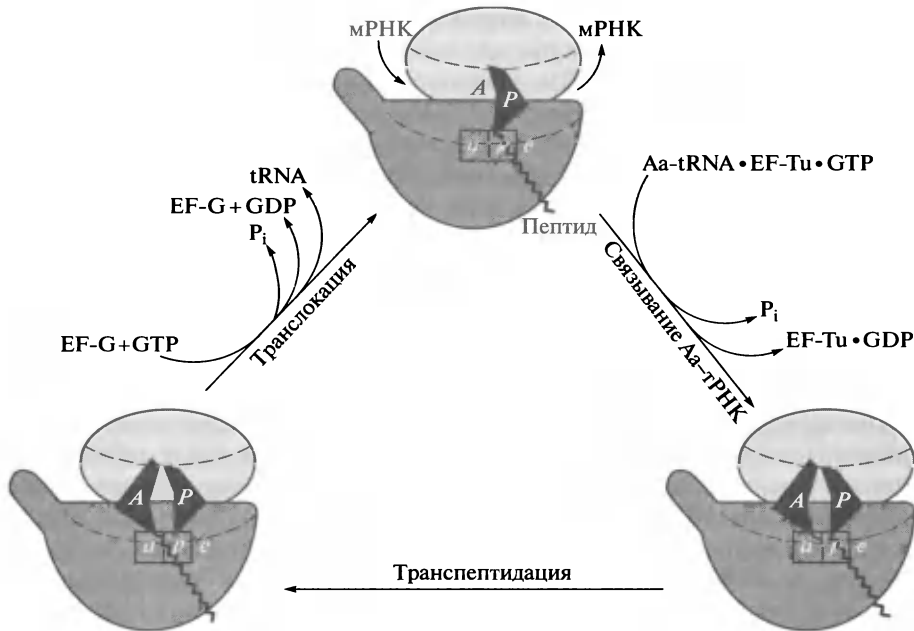


Рис. 18.1. Рабочий цикл транслирующей рибосомы как молекулярной транспортной машины конвейерного типа. В каждом цикле рибосома выбирает из среды одну молекулу аминоацил-тРНК, освобождает в раствор одну молекулу деацилированной тРНК и протаскивает сквозь себя цепь мРНК на три нуклеотида.

Связывание аминоацил-тРНК и транслокация катализируются белками EF1A (EF-Tu) и EF2 (EF-G) соответственно и сопровождаются гидролизом ГТФ

химическую энергию в направленное молекулярное движение (Спирин, 2002, 2004).

Транслирующая рибосома представляет собой типичную молекулярную машину, осуществляющую прогон крупных молекулярных масс тРНК сквозь свое межсубъединичное пространство и сопряженное протягивание цепи мРНК в определенном направлении (рис. 18.1). Следовательно, рибосома должна быть охарактеризована как транспортная молекулярная машина конвейерного типа, использующая свободную энергию реакций транспептидации и гидролиза ГТФ. В то же время она является технологической молекулярной машиной, строящей белок из подводимых к ней аминокислотных остатков. Очевидно, что в качестве транспортной молекулярной машины конвейерного типа рибосома должна сама обладать определенной механической подвижностью.

18.3.2. Крупноблочная подвижность

Итак, способность рибосомы протягивать сквозь себя цепочку мРНК в процессе элонгации и перемещать относительно крупные молекулярные массы тРНК в каждом цикле элонгации (см. рис. 18.1) предполагает ее собственную механическую подвижность. Так как структурным каркасом рибосомы является рибосомная РНК и основные функциональные активности рибосомы, такие как связывание аминоацил-тРНК, транспептидация и транслокация, определяются тоже

ее рибосомной РНК, то рибосома может рассматриваться как молекулярная машина, в основе которой лежат прежде всего структурные особенности ее двух высокополимерных молекул РНК. В таком рассмотрении существенно, что конформация рибосомной РНК — ее третичная структура — характеризуется, с одной стороны, способностью к конформационным перестройкам (внутримолекулярной подвижностью) и, с другой стороны, наличием стабильных компактных структурных блоков (доменов или групп доменов), которые могут рассматриваться как достаточно жесткие тела (см. гл. 6).

Конформационные переходы в высокополимерных РНК были впервые выявлены *in vitro* на изолированных препаратах вирусных и рибосомных РНК как изменения общей конфигурации их макромолекул в ответ на изменения температуры, ионной силы раствора и концентрации ионов магния (см. рис. 1.15 и подразд. 6.4.1). Было показано, что компактно свернутое состояние РНК может сильно меняться в результате нарушения сравнительно небольшого количества внутрицепочечных нековалентных взаимодействий. Эти наблюдения были интерпретированы как свидетельства конформационной подвижности структурированной РНК. Далее было показано, что свойство конформационной подвижности РНК сохраняется и в случае рибосомных РНК в составе рибосомных частиц: воздействия ионной силы и концентрации ионов магния в среде на компактные рибосомные частицы приводили к конформационным изменениям, аналогичным таковым в случае изолированных РНК (Спирин и др., 1963, 1966; см. подразд. 6.4.3). В 2000-х гг. изучение величин и направлений смещений доменов, субдоменов и спиралей РНК в кристаллах рибосом методом рентгеноструктурного анализа позволило визуализировать анизотропную термальную подвижность соответствующих структурных блоков рибосомной РНК в составе рибосомы и интерпретировать ее как основу функциональных конформационных изменений рибосомы в процессе трансляции (Коростелев и Ноллер, 2007).

18.3.2.1. Подвижность структурных блоков малой рибосомной субъединицы

В малой (30S) рибосомной субъединице блок спиралей h30-h34 домена III 16S рРНК (см. рис. 6.1 и 8.13) особенно выделяется своей анизотропной подвижностью. Этот блок формирует «клюв» малой субъединицы — выступающую часть головки при входе в А-участок. Действительно, при связывании тРНК (ее антикодонной шпильки) в А-участке 30S субъединицы происходит сближение этого блока с «плечом» — участком тела субъединицы, формируемым кустом спиралей h3-h4, h16-h18 домена I (см. рис. 6.1 и 6.6) вместе с белком S4 (Памакришнан и др., 2002; см. также подразд. 9.1.6 и рис. 9.3). При этом происходит также и движение головки как единого блока относительно тела субъединицы — она в целом несколько склоняется к «плечу» и поворачивается на «шее» (спираль h28) «клювом» в сторону контактирующей поверхности. В рентгеноструктурных исследованиях рибосомы в разных состояниях наблюдался поворот головки относительно тела до 12° , или на 20 \AA , у межсубъединичной границы (Кейт и др., 2005). Подвижность головки относительно тела как двух самостоятельных структурных блоков 30S субъединицы играет, по-видимому, принципиальную роль в работе рибосомы как молекулярной машины.

Для межсубъединичной подвижности (см. далее), по-видимому, весьма важно вращение 3'-концевого минорного домена 16S рРНК — блока спиралей h44-h45.

Спираль h44 — самая длинная шпилька малой субъединицы, проходящая через все тело от головки до его дистальной части на контактирующей поверхности субъединицы (см. рис. 6.6), — образует ряд важных контактов с поверхностью большой (50S) субъединицы, ответственных за удержание обеих субъединиц в ассоциированном (70S) состоянии (см. подразд. 7.7.4). Эта спираль предрасположена к вращению вокруг оси, ориентированной почти параллельно ее длинной оси и проходящей по ее внутренней (обращенной к телу малой субъединицы) стороне (Коростелев и Ноллер, 2007). Таким образом, при вращении внешняя сторона спирали h44, контактирующая с большой субъединицей, должна смещаться больше, чем внутренняя, и, следовательно, ее вращение должно сопровождаться смещением двух субъединиц рибосомы относительно друг друга, причем как в плоскости разъема между субъединицами (взаимное скольжение субъединиц), так и в направлении, перпендикулярном границе раздела (сдвигание-раздвигание субъединиц). Возможно, именно такое движение сопровождает транслокацию тРНК в рибосоме в процессе элонгации (см. далее).

Значительной подвижностью относительно остальной части малой (30S) рибосомной субъединицы обладает также ее боковая лопасть («платформа»), сформированная доменом II 16S рРНК, причем крайняя боковая спираль лопасти — h23 (см. рис. 6.6) — оказывается особенно мобильна (Франк и др., 2000; Коростелев и Ноллер, 2007). В целом боковая лопасть имеет тенденцию несколько скручиваться, так что ее периферийная часть отдалается от большой субъединицы, и в то же время ее средняя часть прижимается к головке малой субъединицы; в результате такого движения между боковой лопастью и головкой образуется щель, или канал. Это движение реализуется при связывании мРНК, когда через образованную щель проходит двойная спираль с участием последовательности Шайна — Дальгарно (спираль SD-antiSD).

18.3.2.2. Подвижность структурных блоков большой рибосомной субъединицы

В соответствии со значительной структурной слитностью доменов рРНК большой рибосомной субъединицы (см. подразд. 6.5.2) ее междоменная подвижность весьма ограничена, и, в отличие от малой рибосомной субъединицы, для основной части (тела) большой субъединицы характерно отсутствие возможностей больших конформационных перестроек и междоменных сдвигов. С другой стороны, исключительно подвижными блоками большой рибосомной субъединицы оказываются ее два боковых выступа — L7/L12-стержень («палец») со стороны входа в межсубъединичный канал рибосомы и L1-выступ со стороны выхода из канала. Подвижность столь высока, что не «замораживается» даже в кристаллах рибосом или их больших субъединиц, и это не позволяет видеть их структуры на картах электронной плотности при рентгеноструктурном анализе рибосомных частей.

Высокая подвижность L7/L12-стержня, показанная методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР), была первым убедительным свидетельством существования мобильности структурных блоков в рибосоме (Гудков, Бушуев и др., 1982). Следует отметить, что в данном случае мобильность выступа обусловлена как специфической структурой самого белка L7/L12 (см. рис. 7.3, Б), так и конформационной подвижностью основания выступа — блока спиралей H42 — H43 — H44. На рисунке видно, что глобулярные домены белка свободно подвешены на гиб-

ких полипептидных тяжях к димерам спиральных доменов, прикрепленным к рибосомной частице, и могут играть роль «молекулярных удочек» для вылавливания факторов элонгации и других ГТФ-зависимых факторов трансляции из раствора. Вместе с тем димеры спиральных доменов белка L7/L12 связаны в рибосоме с белком L10 и через него с белком L11, белками, сидящими на блоке спиралей H42—H43—H44 (домен II 23S рРНК; см. рис. 6.2, А и рис. 6.7), который характеризуется высокой подвижностью относительно остальной части 23S рРНК (Коростелев и Ноллер, 2007).

Самой высокой мобильностью в структуре большой рибосомной субъединицы обладает L1-выступ, и в данном случае мобильность обеспечивается целиком подвижностью блока спиралей H76—H78 (домен V 23S рибосомной РНК; см. рис. 6.2, Б и рис. 6.7) (Йонат и др., 2001; Франк и др., 2003; Коростелев и Ноллер, 2007), с которым стабильно связан двудоменный глобулярный белок L1. Как уже было указано, L1-выступ находится у самого выхода из межсубъединичного канала и движется приблизительно в плоскости границы между субъединицами, своей дистальной частью либо приближаясь к выходу из канала, либо отклоняясь от него на целых 20 Å. Таким образом, когда L1-выступ прижат к боковой поверхности рибосомы, он может прикрывать выход для деацелированной тРНК и открывать выход, когда отклонен от нее («молекулярный шлагбаум»). Более того, внешний угол молекулы деацелированной тРНК в *E*-участке рибосомы взаимодействует с белком L1, находящимся в прижатом к выходу состоянии, и его движение от малой субъединицы может активно способствовать извлечению деацелированной тРНК из рибосомы при завершении транслокации.

Интересно заметить, что высокая подвижность обоих выступов большой рибосомной субъединицы обеспечивается в основном конформационными изменениями спиралей РНК, а не перестройками третичной структуры РНК (Кейт и др., 2005).

18.3.2.3. Взаимная подвижность рибосомных субъединиц

Наиболее функционально важное и структурно масштабное конформационное изменение рибосомы — безусловно смещение двух рибосомных субъединиц относительно друг друга. Идея о возможной взаимной подвижности рибосомных субъединиц родилась в результате осмысления первого принципа структурной организации рибосомной частицы — ее построения из двух разнофункциональных, лабильно ассоциированных и разделяемых субчастиц (Спирин, 1968, 1969; Бретчер, 1968). В самом деле, каково могло бы быть назначение двусубъединичной конструкции рибосомы, столь эволюционно консервативной и универсальной для всех организмов? Предположение состояло в том, что именно взаимные смещения двух основных блоков рибосомы — рибосомных субъединиц — либо типа схлопывания-расхлопывания (смыкания-размыкания; рис. 18.2), либо взаимного скольжения вдоль границы раздела — могут обеспечить кинематику прогона молекул тРНК сквозь рибосому и сопряженную механическую протяжку цепи мРНК.

Первое экспериментальное свидетельство о конформационном изменении рибосомы в результате транслокации было получено путем сравнения рибосом в претранслокационном и посттранслокационном состояниях методом диффузного нейтронного рассеяния: было показано, что радиус инерции рибосомы в



Рис. 18.2. Гипотеза смыкания-размыкания транслирующей рибосомы в ходе ее рабочего цикла.

Связывание аминоксил-тРНК индуцирует смыкание, в сомкнутой рибосоме происходит транспептидация, и размыкание сопровождается передвижением остатков тРНК и цепи мРНК (транслокацией).

Спирин (1968) *ДАН СССР* 179: 1467—1470

посттранслокационном состоянии несколько больше, чем радиус инерции до транслокации, т.е. претранслокационная рибосома немного компактнее, чем посттранслокационная (Спирин, Сердюк и др., 1987). Несколько большая компактность претранслокационной рибосомы коррелировала также с ее несколько большим коэффициентом седиментации. Этот результат мог указывать на то, что транслокация приводит к некоторому раздвиганию рибосомных субъединиц. Однако дальнейшие эксперименты и уточнение данных по нейтронному рассеянию привели к выводу, что основной вклад в увеличение радиуса инерции рибосомы после транслокации вносит конформационное изменение малой рибосомной субъединицы при неизменности большой (Сердюк, Спирин и др., 1992). Действительно, в настоящее время из рентгеноструктурных исследований известно, что связывание тРНК с А-участком рибосомы вызывает смыкание головки (ее «клюва») с «плечом» малой субъединицы и небольшой поворот головки с приближением «клюва» к большой субъединице (см. подразд. 18.3.2.1). Возможно, именно эти конформационные изменения и объясняют несколько бóльшую компактность полной рибосомы в претранслокационном состоянии по сравнению с посттранслокационным, наблюдавшуюся в опытах по нейтронному рассеянию.

Настоящее межсубъединичное смещение было экспериментально открыто с помощью криоэлектронной микроскопии высокого разрешения (Франк и Агравал, 2000) и затем его конкретный характер подтвержден и уточнен рентгеноструктурным анализом (Ноллер и др., 2007), а также методом резонансного переноса энергии между флуоресцентными метками (Ермоленко, Ноллер и др., 2007). Это — небольшое вращательное смещение малой рибосомной субъединицы как целого относительно большой субъединицы вокруг оси, перпендикулярной границе раздела между субъединицами и проходящей приблизительно через верхнюю часть спирали h44 малой субъединицы и пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) большой субъединицы (рис. 18.3). Амплитуда поворота — до 6°, смещение на периферии субъединиц у бокового края с белками L9, S11 и S6 — до 8 Å. Поворот против часовой стрелки оказался состоянием, индуцируемым связыванием ГТФ-зависимых факторов трансляции — EF-G, IF2, RF3, но после гидролиза ГТФ и освобождения фактора восстанавливается исходное

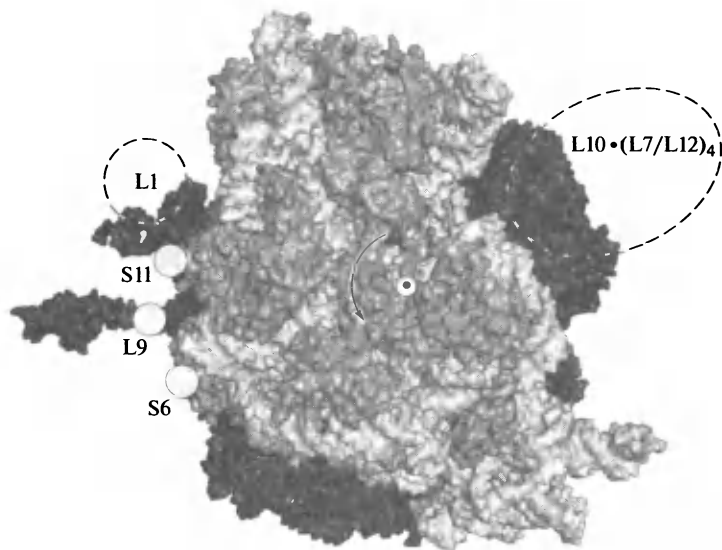


Рис. 18.3. Схема эксперимента, демонстрирующего вращательный сдвиг малой рибосомной субъединицы относительно большой против часовой стрелки при присоединении фактора элонгации EF-G к рибосоме.

Флюоресцентные метки (белые кружки на схеме) были предварительно помещены на белки S6 и S11 30S субъединицы и на белок L9 50S субъединицы. Измерения резонансного переноса энергии между флюорофорами показало, что связывание EF-G с рибосомой в присутствии негидролизующего аналога ГТФ приводит к сближению белка S11 с белком L9 и одновременно к удалению белка S6 от белка L9. Стрелкой показано направление вращательного смещения, а белым кружком с точкой — центр вращения. На приведенной схеме использованы кристаллографические модели рибосомных субъединиц *E. coli* в формате «поверхность», по Schuwirth et al. 2005. *Science* **310**: 827–834; PDB ID 1VS5, 1VS6. Белок L1 и белковый комплекс L10•(L7/L12)₄ не разрешаются на рентгенограммах ввиду высокой подвижности соответствующих боковых выступов 50S субъединицы и поэтому схематически дорисованы пунктирными линиями.

Ermolenko et al. (2007). *J. Mol. Biol.* **370**: 530–540

относительное расположение субъединиц (происходит обратный поворот по часовой стрелке). Интересно, что такой же поворот против часовой стрелки может осуществляться и спонтанно, сопровождая спонтанный переход из состояния *A/a*, *P/p* в «гибридное» состояние *A/p*, *P/e* после транспептидации (см. подразд. 10.4 и рис. 10.5); последующая транслокация (переход *A/p*, *P/e* → *P/p*, *E/e*; см. рис. 11.15) возвращает рибосому к исходному взаиморасположению субъединиц.

18.3.3. Концепция смыкания-размыкания: «открытые» (релаксированные) и «закрытые» (фиксированные) конформации

Согласно первоначальной гипотезе о крупноблочной анизотропной подвижности рибосомы в процессе трансляции (Спирин, 1968, 1969), именно некоторое расхождение (размыкание) двух рибосомных субъединиц необходимо для механического перемещения ее лигандов — тРНК и мРНК. Если рассуждать в общих терминах, то любой макромолекулярный комплекс, в котором осуществляются связывание и направленные смещения крупных лигандов, их переход из одного

места связывания в другое, должен осциллировать между «закрытым» и «открытым» состояниями, чтобы избежать высоких кинетических барьеров в процессах диссоциации и ассоциации этих лигандов. Рассматриваемый макромолекулярный комплекс разомкнут («открыт») для входа и предварительного связывания лиганда, перемещения лиганда в комплексе и обеспечения выхода лиганда из комплекса. Макромолекулярный комплекс смыкается вокруг лиганда («закрывается») для того, чтобы обеспечить точное многоцентровое узнавание крупного лиганда («индуцированное соответствие»), а также чтобы правильно и жестко ориентировать лиганд в комплексе для последующей химической атаки. Таким образом, разомкнутый («открытый») комплекс предоставляет относительную свободу передвижения лиганду (включая вход и выход), а сомкнутый («закрытый») его фиксирует и иммобилизует. В свое время именно эта концепция легла в основу гипотезы смыкания-размыкания рибосомных субъединиц при функционировании рибосомы. Согласно гипотезе, аминоацил-тРНК (или тройственный комплекс Aa-tRNA•EF2•GTP) связывается с рибосомой в ее разомкнутом состоянии, результатом связывания аминоацил-тРНК является смыкание блоков рибосомы с последующей транспептидацией в сомкнутом состоянии, а транслокация требует размыкания блоков рибосомы для перемещения пептидил-тРНК и выхода деацелированной тРНК (см. рис. 18.2).

Впоследствии принцип смыкания блоков макромолекулы при связывании лиганда с последующей химической реакцией превращения связанного лиганда, приводящей к размыканию макромолекулы, был экспериментально продемонстрирован на примере функционирования трехдоменного белка — фактора элонгации EF-Tu (см. подразд. 9.2.1 и рис. 9.4). Этот пример может быть рассмотрен как парадигма молекулярного механизма сопряжения связывания лиганда и его распада с крупноблочной подвижностью белка. Следует напомнить, что белок EF-Tu состоит из двух подвижно сочлененных половинок — домена I и блока доменов II и III. Домен I имеет ГТФ-связывающий центр. В отсутствие лиганда (ГТФ) белок находится в «рыхлой», или релаксированной (разомкнутой), конформации: две половинки раздвинуты, а точнее подвижно сочленены друг с другом, осциллируя между разными состояниями компактности. Когда молекула ГТФ связывается с доменом I, ее отрицательно заряженная γ -фосфатная группа индуцирует локальную перестройку окружающих ее атомов белка, приводя к конформационным сдвигам в районе домена I на границе с доменами II и III. В частности, пограничная α -спираль домена I несколько поворачивается и экспонирует новые группы на границе с доменом III, обеспечивая хороший контакт указанной спирали и β -слоя домена III. Это изменение и другие ГТФ-индуцированные локальные сдвиги в домене I вызывают плотное смыкание блоков белка. Такое сомкнутое фиксированное состояние белка приводит к воссозданию междоменного участка (междоменной щели) для связывания молекулы аминоацил-тРНК. С другой стороны, связывание ГТФ с доменом I индуцирует локальную перестройку так называемой эффекторной петли — ее переход из β -структуры в α -спираль, что придает белку средство к рибосоме. Когда тройственный комплекс Aa-tRNA•EF-Tu•GTP взаимодействует с рибосомой, активируется ГТФаза белка, ГТФ гидролизует и белок возвращается в разомкнутое — релаксированное — состояние: его половинки более не скреплены жестко, и им «позволено» раздвигаться и пребывать в состоянии относительной подвижности друг относительно друга. В таком состоянии белок более не удерживает аминоацил-тРНК и не удерживается на рибосоме.

Важным шагом в утверждении концепции смыкания-размыкания макромолекулярных блоков при функционировании рибосомы было открытие перехода тРНК-связывающего участка малой рибосомной субъединицы из открытого в «закрытое» состояние при связывании тРНК (Рамакришнан и др., 2002). Как отмечалось в подразд. 18.3.2.1, связывание антикодоновой шпильки в *A*-участке 30S субъединицы влечет за собой наклон головки относительно тела субъединицы, соответствующее сближение «клюва» с «плечом» и смыкание блока спиралей h33—h34 с блоком спиралей h16—h18 (см. рис. 6.6 и 8.13). Антикодоновая шпилька аминоацил-тРНК оказывается запертой в *A*-участке. Индукция (стабилизация) закрытой конформации *A*-участка молекулой тРНК необходима для обеспечения точного многоцентрового связывания («индуцированное соответствие») и, следовательно, специфического узнавания молекулы и ее правильной (продуктивной) ориентации в рибосоме.

Проблема сомкнутого и разомкнутого состояний полной рибосомы за счет взаимной подвижности рибосомных субъединиц как цельных блоков оказалась не столь очевидно решаемой. Основное смещение субъединиц друг относительно друга, экспериментально наблюдаемое в криоэлектронно-микроскопических и рентгеноструктурных исследованиях, — это поворот малой субъединицы относительно большой вокруг оси, приблизительно перпендикулярной поверхности раздела между субъединицами (см. подразд. 18.3.2.3), как показано на рис. 18.3. Этот поворот небольшой — не более 6° , но именно двойной поворот — сначала против часовой стрелки, а затем обратно, по часовой стрелке — сопряжен с транслокацией лигандов (тРНК) внутри рибосомы, в ее межсубъединичном пространстве.

На самом деле, как показывает спонтанность рассматриваемых поворотов туда и обратно в отсутствие факторов элонгации и ГТФ (Валле и др., 2008), оба состояния рибосомы — «исходное» и «повернутое» — находятся, по-видимому, в равновесии, и связывание фактора элонгации с нерасщепляемым аналогом ГТФ лишь сдвигает равновесие в сторону «повернутого» состояния — фактически, фиксирует его. Важно, что именно в «повернутом» состоянии рибосомы происходит транслокация пептидил-тРНК из *A*- в *P*-участок в межсубъединичном пространстве рибосомы. Таким образом, согласно всем функциональным тестам, «повернутое» состояние соответствует *разомкнутому состоянию* транслирующей рибосомы.

Интересен также вопрос о сомкнутых и разомкнутых конформациях в районах подвижных боковых выступов большой рибосомной субъединицы. Во всяком случае показано, что связывание ГТФ-зависимых факторов трансляции с рибосомой иммобилизует подвижный боковой L7/L12-выступ (Гудков, Бушуев и др., 1984). Здесь довольно очевидно, что связывание большого лиганда — белкового фактора трансляции — с РНК-белковым блоком бокового выступа приводит к сомкнутому состоянию соответствующей структуры большой рибосомной субъединицы у входа в межсубъединичный канал. Сомкнутое состояние выхода из субъединичного канала при взаимодействии другого бокового выступа — РНК-белкового блока L1-N76-N78 — с деацилированной тРНК в *E*-участке еще более очевидно (Франк и др., 2003).

В сомкнутом состоянии этот выступ большой рибосомной субъединицы оказывается приближенным к центральному выступу. Разомкнутое состояние L1-блока, когда он отодвигается от тела большой субъединицы, сопряжено с освобождением лиганда — деацилированной тРНК.

18.3.4. Переходные конформационные состояния и ГТФ-зависимый катализ конформационных переходов

Ввиду многоцентрового характера связывания больших лигандов в макромолекулярном комплексе, таком как рибосома, неизбежны высокие кинетические барьеры как при ассоциации лиганда с комплексом, так и при его диссоциации, если допускать одновременное формирование или разрушение контактов между достаточно обширными поверхностями жестких взаимодействующих макромолекул. Конформационная гибкость и блочная подвижность макромолекул могут обеспечить необходимые условия для прохождения процессов ассоциации-диссоциации (присоединения-отсоединения) через промежуточные состояния с частично сформированными или соответственно частично разорванными контактами между основным комплексом и лигандом. Следовательно, промежуточные состояния необходимы, чтобы избежать кинетической блокады при многоцентровых взаимодействиях макромолекул. Из вышеизложенного прямо проистекает возможность катализа конформационных перестроек и переходов. Подобно энзиматическому катализу ковалентных химических реакций, базирующемуся на сродстве фермента к переходному состоянию реакции, катализ конформационных перестроек возможен за счет сродства белка — катализатора перестройки — к *переходному конформационному состоянию*. Такими катализаторами конформационных перестроек рибосомы и являются, очевидно, факторы элонгации EF-Tu (eEF1A у эукариот) и EF-G (eEF2), так же как и другие ГТФ-зависимые факторы трансляции — IF2 (eIF2) и RF3 (eRF3).

Действительно, EF-Tu делает кодонзависимое связывание аминоксил-тРНК с рибосомой быстрым, в противоположность относительно медленному «неэнзиматическому» связыванию аминоксил-тРНК (см. подразд. 9.2.2 и рис. 11.5). То же самое можно сказать о EF-G и транслокации: хотя транслокация в рибосоме может протекать спонтанно, особенно в условиях общего ослабления Mg^{2+} -зависимых контактов, EF-G с ГТФ сильно ускоряют этот процесс (см. подразд. 11.3 и рис. 11.5). Таким образом, благодаря участию факторов элонгации процесс элонгации становится по крайней мере на два порядка величины более быстрым, чем без белковых факторов (Спирин, 1978; Четверин и Спирин, 1982). Однако каталитическое действие факторов элонгации имеет важную особенность: катализ в этих случаях сопряжен с гидролизом ГТФ. Сопряжение катализа с гидролизом нуклеозидтрифосфатов (НТФ) присуще не только процессам, происходящим в ходе трансляции, оно часто встречается при самых различных явлениях ускорения нековалентных, конформационных перестроек макромолекул определенными белками, которые предложено рассматривать как отдельный класс ферментов и называть энергазами (Пурич, 2001). Следует напомнить, что сами катализируемые процессы во всяком случае такие, как кодонзависимое связывание аминоксил-тРНК и транслокация пептидил-тРНК в рибосоме, термодинамически спонтанны и не требуют энергии для превращения ее в полезную работу. Следовательно, когда ГТФ используется в этих процессах, энергия тратится на преодоление кинетических барьеров, а также на обеспечение необратимости отдельных шагов элонгационного цикла и увеличение точности трансляции (см. гл. 9). Свободная энергия, освобождаемая в реакциях EF-Tu- и EF-G-зависимого гидролиза ГТФ, в конечном счете диссипирует в тепло, без вклада в накопление полезной работы.

Необходимость гидролиза ГТФ в процессе катализа связывания аминоксил-тРНК или транслокации (или гидролиза АТФ в других случаях катализа некова-

лентного превращения «энергазами») может быть выведена из следующего соображения. В случае энзиматического катализа ковалентной экзергонической реакции вслед за образованием комплекса фермента с интермедиатом в переходном состоянии происходит распад интермедиата и образование продуктов реакции, уже не обладающих прежним сродством к ферменту. Таким образом, освобождение фермента при завершении реакции «оплачивается» изменением свободной энергии самой катализируемой экзергонической реакции. В случае же катализа конформационного перехода фактором элонгации катализируемый процесс не является химической реакцией, идущей с понижением свободной энергии. Если фактор элонгации с ГТФ уменьшает кинетический барьер конформационного перехода тоже благодаря сродству к интермедиату в переходном состоянии (в данном случае переходной конформации), то десорбция фактора, необходимая для завершения конформационного перехода, должна требовать энергетической компенсации за счет какого-то экзергонического (понижающего свободную энергию) процесса, например химической реакции гидролиза ГТФ. Очевидно, по тем же причинам энзиматический катализ конформационных изменений макромолекул и их комплексов во многих других случаях также сопровождается гидролизом нуклеозидтрифосфатов.

Поскольку связывание большого лиганда обычно сопровождается «индуцированным соответствием», которое максимизирует контакты между лигандом и связывающим его участком, переход от разомкнутой конформации к более «закрытой» (сомкнутой) представляется наиболее частым и естественным результатом такого взаимодействия. Наоборот, химическая реакция, ведущая к расщеплению или другой трансформации связанного лиганда, как правило, вызывает частичную утрату контактов, приведших к смыканию конформации лигандсвязывающего участка и, тем самым, к размыканию, т.е. к более «открытой», или релаксированной, конформации. Из вышеизложенного следует, например, что связывание фактора элонгации с ГТФ должно индуцировать конформационное смыкание какого-то типа в рибосоме, в то время как гидролиз факторсвязанного ГТФ — релаксацию (размыкание) предварительно фиксированного состояния. Это полностью согласуется с наблюдаемой иммобилизацией гибкого и подвижного бокового выступа, несущего белки L7/L12, при взаимодействии с фактором элонгации (EF-G) и негидролизуемым аналогом ГТФ, и с его освобождением в результате гидролиза ГТФ (см. ранее). Криоэлектронно-микроскопические наблюдения (Франк, Ниссен и др., 2003) также привели к выводу о двух конформациях так называемого «ГТФазного центра» в основании указанного бокового выступа, одна из которых — «закрытая» — наводится присоединением EF-Tu•GTP в составе тройственного комплекса с аминоацил-tРНК, а другая — «открытая» — существует до взаимодействия с EF-Tu и после его ухода.

Возникает вопрос, каким образом индукция локального конформационного перехода бокового выступа может приводить к катализу кодонзависимого связывания аминоацил-tРНК с A-участком рибосомы (в случае EF-Tu) или смещения пептидил-tРНК и деацилированной tРНК в межрибосомном пространстве (в случае EF-G). В любом случае представляется весьма вероятным, что для этих двух различных передвижений лигандов необходимо одно общее условие — рибосома должна быть тем или иным образом разомкнута, чтобы участки связывания лигандов были открыты для входа в них лигандов и выхода из них. Следовательно, приходится предположить, что смыкание факторсвязывающего участка с участием бокового выступа большой субъединицы как-то сопряжено с размыка-

нием межсубъединичного пространства. Как уже отмечалось ранее (см. подразд. 18.3.3 и рис. 18.3), согласно данным, полученным разными методами — криоэлектронной микроскопией, рентгеноструктурным анализом и резонансным переносом энергии между флюоресцентными метками, — связывание EF-G с нерасщепляемым аналогом ГТФ фиксирует рибосому в состоянии, когда малая субъединица несколько повернута относительно большой против часовой стрелки. Весьма вероятно, что наблюдаемый поворот сопряжен с ослаблением некоторых межсубъединичных контактов, тем самым приводя к более рыхлому состоянию ассоциации рибосомных субъединиц. Структурное сходство EF-Tu и EF-G, зависимость обоих катализаторов от ГТФ, а также общая для них «посадочная площадка» на большой субъединице рибосомы позволяют предположить, что последовательности событий и сценарии катализа в этих двух случаях имеют много общего. Отсюда можно заключить, что процесс связывания тройственного комплекса Aa-tRNA•EF-Tu•GTP, сопровождающийся смыканием бокового L7/L12-выступа, тоже должен приводить к какому-то промежуточному, или переходному, разомкнутому состоянию рибосомы.

18.3.5. Рибосома как изотермическая тепловая машина с конформационным «храповиком» и химической «собачкой»

18.3.5.1. Особенности молекулярных машин

Частое заблуждение при рассмотрении молекулярных машин — проведение аналогий с привычными энергосиловыми макромашинами, предназначенными для преобразования любого вида энергии (тепловой, химической, электрической) в механическую. Однако физические свойства микромира сильно отличаются от свойств макромира, и целый ряд принципов, на которых базируется работа энергосиловых машин, таких как двигатели внутреннего сгорания или электрические двигатели, не может быть реализован на уровне макромолекул. Прежде всего необходимо отметить три главные особенности молекулярных машин.

1. *Малая масса макромолекул и их структурных блоков.* Малая масса предполагает практическое отсутствие инерционности у структурных блоков молекулярных машин и, следовательно, невозможность сохранения количества движения на времена, превышающие долю наносекунды (см. Финкельштейн и Птицын, 2005, с. 113 — 114). Действительно, в молекулярных устройствах оказывается невозможным реализовать сохранение количества движения (т.е. механической энергии) в виде инерционного маховика, скользящего по инерции тела, катящегося колеса или механического маятника.

2. *Конформационная гибкость структурных блоков и сочленений между ними.* Молекулярные тела, такие как белки, нуклеиновые кислоты и их комплексы, построены из гибких полимеров с подвижными боковыми группами и, следовательно, должны плохо удовлетворять требованиям механической точности. Поэтому маловероятно, что в молекулярных машинах могут использоваться жесткие рычаги, рукоятки, крюки, оси, колеса и другие устройства для передачи силы от двигателя к движителю в трансмиссионных устройствах молекулярных машин.

3. *Броуновское движение и собственные тепловые конформационные флуктуации частей молекулярной машины.* Частицы молекулярных размеров подвержены интенсивному броуновскому движению, и, кроме того, гибкость макро-

молекул обеспечивает достаточно широкий спектр и размах их собственных тепловых движений. Отсюда следует, что структурные элементы молекулярных машин не строго фиксированы в пространстве, а претерпевают постоянные конформационные флуктуации, так что работа таких машин должна носить скорее стохастический, чем механически детерминированный характер. В частности, переход от одного состояния к другому на определенных стадиях работы машины может происходить как тепловая флуктуация.

Таким образом, поскольку ни механическая энергия, ни точная механика устройств не могут быть реализованы на молекулярном уровне, молекулярные машины должны рассматриваться как транспортные машины без моторов (во всяком случае моторов типа механических с их инерционными роторами и маховиками), жестких механических трансмиссий и каких бы то ни было колес, гусениц, пропеллеров, весел и т.п. В то же время вышеописанные особенности молекулярных машин позволяют им эффективно выполнять функции направленных перемещений лигандов на молекулярном уровне. Двигатель, трансмиссионные устройства и движитель таких машин оказываются организованными по совершенно другим принципам, по сравнению с макромашинами.

18.3.5.2. Двигатель рибосомы как молекулярной машины

Устройство и функционирование двигателей молекулярных машин базируется на трех основных принципах: 1) способности специфически связывать энергетический субстрат, который фиксирует определенную конформацию двигательной части макромолекулы; 2) способности катализировать реакцию расщепления или иного вида химической трансформации связанного энергетического субстрата; 3) локальной подвижности двигательной части соответствующей макромолекулы в ответ на связывание энергетического субстрата и его распад.

В качестве парадигмы может быть опять рассмотрен пример фактора элонгации EF-Tu как простейшей молекулярной машины (см. рис. 9.4; подразд. 18.3.3 и 9.2.1). Функцией машины в данном случае является эффективная доставка молекул аминоацил-tРНК в транслирующую рибосому. В свободном виде фактор находится в релаксированной конформации, при которой имеет место равновесие между разомкнутой и сомкнутой формами, по-видимому, с сильным сдвигом равновесия в сторону разомкнутой формы. Специфическое связывание энергетического субстрата (ГТФ) с ГТФ-связывающим центром белка приводит к сдвигу конформационного равновесия в сторону сомкнутой формы, т.е. к смыканию блоков и фиксации этого состояния. В сомкнутой конформации фактор связывается с молекулой аминоацил-tРНК и рибосомой. Связь с рибосомой индуцирует ГТФазную активность фактора. В результате этого связанный ГТФ гидролизуется, и, сопряженно с гидролизом, фактор возвращается в релаксированное (разомкнутое) состояние, диссоциирует от аминоацил-tРНК и покидает рибосому. Двигателем рассматриваемой машины служит, очевидно, ГТФ-связывающий/ГТФазный центр домена I, «топливом» — ГТФ. Трансмиссия машины — те конформационные изменения белка от локальных до крупноблочных, которые происходят в ответ на связывание ГТФ и его распад. Механизм трансмиссионного сопряжения связывания ГТФ и его распада с работой фактора, рассмотренный в подразд. 18.3.3, может быть кратко описан так: связывание ГТФ вызывает локальное изменение в районе ГТФ-связывающего центра домена I, которое приводит

к экспонированию новых боковых групп указанного домена в междоменной области белка, вследствие этого домен I приобретает сродство к двум другим доменам белка, в результате этого домены смыкаются. Гидролиз ГТФ, катализируемый доменом I после связывания тройственного комплекса Aa-tRNA•EF-Tu•GTP с рибосомой, восстанавливает разомкнутое состояние белка по тому же сценарию, но развивающемуся в противоположном направлении. Двигатель машины — попеременно возникающее и исчезающее сродство белка к аминоксил-тРНК и рибосоме (подробнее см. подразд. 9.2). Однако в данном примере отсутствует явная конвейерная функция — однонаправленное перемещение каких-либо субстратов или лигандов относительно машины, хотя челночная функция — вхождение в рибосому и выход из нее — имеет место.

Безусловно, настоящей транспортной машиной конвейерного типа является транслирующая рибосома. Ее транспортный субстрат — это остатки аминоксил-тРНК и пептидил-тРНК в комплементарном комплексе с мРНК. В ходе трансляции кодон-антикодоновые комплексы мРНК с тРНК передвигаются относительно рибосомы строго в направлении от бокового выступа L7/L12 к боковому выступу L1 (см. рис. 18.1) или, что то же самое, рибосома движется по цепи мРНК в направлении от 5'-проксимального остатка связанной тРНК (*P*-участок) к 3'-проксимальной тРНК (*A*-участок).

В целях упрощения анализа работы самой рибосомы как машины удобно рассмотреть цикл бесфакторной («неэнзиматической») трансляции (см. также подразд. 11.3). Основные взаимно подвижные блоки рибосомы, лежащие в основе ее собственной двигательной функции, — это две составляющие ее субъединицы, а также головка и тело малой субъединицы. Нетранслирующая рибосома без лигандов представляет собой относительно лабильный ассоциат субъединиц, которыми он может обмениваться со свободными субъединицами среды; положение равновесия реакции ассоциации-диссоциации нетранслирующих рибосом без связанных лигандов (аминоксил- и пептидил-тРНК) зависит от концентрации ионов магния и других ионных условий (см. подразд. 5.1 и рис. 5.4). Уже давно было показано, что кодонзависимое связывание лиганда — аминоксил- или пептидил-тРНК — сдвигает равновесие в сторону более стабильной ассоциации субъединиц (Белицина и Спиринов, 1970). Рибосомы, содержащие оба лиганда, еще более стабильны, и, по-видимому, их субъединицы плотно сомкнуты. Посттранслокационная транслирующая рибосома, очевидно, подобна рибосоме с одним лигандом — пептидил-тРНК, располагающимся в *P*-участке; ее *A*-участок свободен. Субъединицы в такой рибосоме, находясь между собой в постоянной ассоциации, относительно лабильно связаны друг с другом, и рибосома осциллирует между альтернативными конформациями — сомкнутой и разомкнутой. Действительно, показано, что посттранслокационная рибосома с одним лигандом в *P*-участке осциллирует между «исходным» и «повернутым» состояниями (см. подразд. 18.3.3 и рис. 18.3) при положении равновесия, сдвинутом в сторону «исходного» состояния (Ноллер, Ха и др., 2008).

Ниже приведен гипотетический сценарий работы рибосомы в процессе бесфакторной трансляции, описанной в подразд. 11.3, с использованием представления о переходах между сомкнутым и разомкнутым состояниями (рис. 18.4). Посттранслокационная рибосома осциллирует между сомкнутым и разомкнутым («повернутым») состояниями субъединиц (состояния I и I'). Специфическое связывание аминоксил-тРНК с транслирующей рибосомой начинается с кодон-антикодонного узнавания в *A*-участке малой субъединицы при коротко живущем

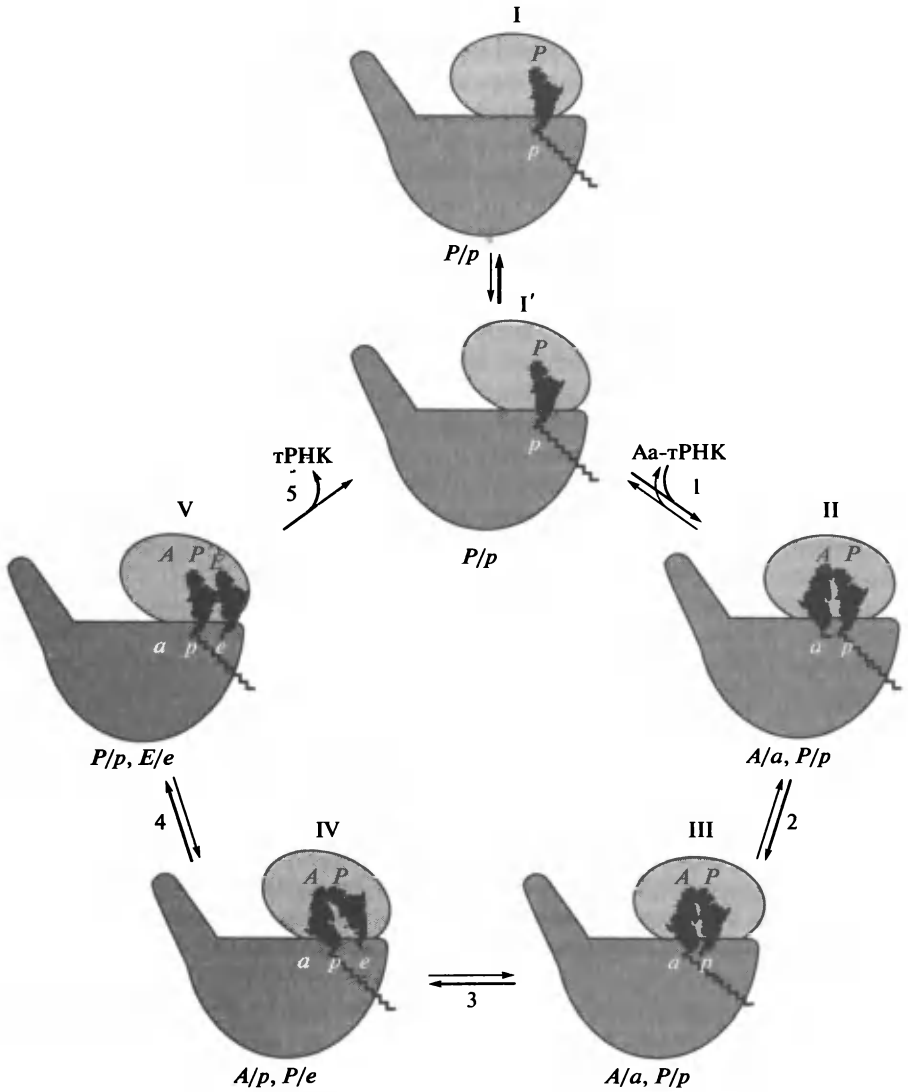


Рис. 18.4. Рабочий цикл бесфакторной трансляции в терминах конвейерного перемещения тРНК-лигандов сквозь межсубъединичный канал рибосомы со спонтанными пошаговыми переходами от состояний более слабого связывания к состояниям более сильного связывания.

I', I—V — состояния рибосомного комплекса; 1—5 — шаги цикла. Пояснения см. в тексте

разомкнутом состоянии с последующим смыканием и фиксацией сомкнутого состояния за счет взаимодействия аминокислотного конца аминокислот-тРНК с *a*-участком пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) большой субъединицы (шаг 1). В сомкнутом состоянии рибосомы (II) происходит реакция транспептидации (шаг 2) — аминокислотная группировка лиганда трансформируется в пептидную группу (состояние III), теряя сродство к *a*-участку ПТЦ и приобретая сродство к *p*-участку. В то же время в *p*-участке ПТЦ исчезает сложноэфирная группа, и возникает свободная гидроксильная группа конечного аденозина тРНК. Это значительное изменение химической ситуации в ПТЦ большой субъединицы в результате транспептидации приводит к дестабилизации сомкнутого состояния и,

таким образом, к возможности перехода в разомкнутое («повернутое») состояние (шаг 3). Действительно, экспериментально показано, что в результате транспептидации резко возрастают скорости как прямой, так и обратной реакций перехода между состояниями рибосомы со сдвигом равновесия в сторону разомкнутого («повернутого») состояния (Ноллер, Ха и др., 2008). В разомкнутом состоянии рибосомы происходит транслокация — спонтанный переход продуктов реакции — пептидил-тРНК и деацилированной тРНК — из состояния A/a , P/p сначала в «гибридное» состояние A/p , P/e (состояние IV), а затем в посттранслокационное состояние P/p , E/e , когда кодон-антикодоновые комплексы и сами тела двух остатков тРНК перемещаются в направлении бокового выступа L1 рибосомы, из положений A и P в положения P и E (шаг 4, состояние V) с последующим спонтанным освобождением деацилированной тРНК и возвращением к исходному состоянию (шаг 5). Диссоциация деацилированной тРНК из рибосомы как результат транслокации обуславливает необратимость всего цикла бесфакторной элонгации.

Из вышеописанного сценария следует, что основным двигателем транслирующей рибосомы служит ее пептидилтрансферазный центр, а энергетическим субстратом («топливом») двигателя — поступающие в рибосому молекулы аминоксил-тРНК с их макроэргической сложноэфирной связью между аминоксильным остатком и остатком тРНК. Как и в случае с фактором элонгации EF-Tu и ГТФ (см. рис. 9.4), сначала связывание энергетического лиганда с частицей вызывает фиксацию сомкнутого состояния ее блоков, а затем разрушение лиганда — в данном случае в экзергонической реакции транспептидации — приводит к релаксации частицы с возможностью последующего замыкания.

18.3.5.3. Дополнительные двигатели полного элонгационного цикла

В ходе нормальной факторзависимой трансляции элонгационный цикл использует дополнительное «топливо» — молекулы ГТФ — для ускорения процессов связывания аминоксил-тРНК с рибосомой и транслокации тРНК внутри рибосомы при участии факторов элонгации EF1 (EF-Tu) и EF2 (EF-G) соответственно (см. подразд. 9.2 и 11.2). Это предполагает участие дополнительных молекулярных устройств, потребляющих энергию, в транспортной (конвейерной) функции рибосомы. Другими словами, кроме основного собственного двигателя (см. ранее) рибосома использует два дополнительных двигателя, локализованных в независимых молекулярных машинах белковой природы — факторах элонгации. Работа молекулярной машины такого типа на примере EF-Tu описана в подразд. 18.3.5.2. Однако механизм сопряжения посадки фактора элонгации в ГТФ-форме с ускорением конформационных изменений рибосомы, таких как взаимные сдвиги рибосомных субъединиц и наведение разомкнутого состояния рибосомы, не известен.

18.3.5.4. Трансмиссия и движитель молекулярной машины

Итак, в двигателях молекулярных машин крупноблочная анизотропная подвижность в макромолекулярном комплексе, таком как рибосома, сводится, по видимому, к фиксации (иммобилизации) и релаксации (ремобилизации) определенных конформационных состояний. Обычно фиксация достигается в результа-

те связывания лиганда, вносящего свой энергетический вклад за счет образования нековалентных связей с макромолекулярным комплексом, а релаксация происходит после химического изменения или расщепления связанного лиганда. Согласно концепции чередующихся разомкнутых («открытых») и сомкнутых («закрытых») конформаций при работе молекулярных машин, внутририбосомные перемещения лигандов, прежде всего остатков тРНК, в процессах их связывания и транслокации разрешены именно при разомкнутых состояниях.

Для того чтобы сдвинуть с места и переместить что-либо — лиганд или структурный модуль самого макромолекулярного комплекса — на молекулярном уровне, никаких иных «движущих сил», кроме броуновского движения и собственной тепловой подвижности, не требуется. Следовательно, «движущие силы» в мире макромолекул присутствуют всегда в избытке, и задача, стоящая перед молекулярной машиной, состоит в том, чтобы их сдерживать — во-первых, путем канализации движений, т.е. направления их в нужную сторону (анизотропная подвижность), и, во-вторых, путем остановки движений (иммобилизации) в нужный момент.

Таким образом, в основе функционирования молекулярных машин, в том числе рибосомы, должны лежать конформационные изменения, которые представляют собой события фиксации и релаксации определенных конформационных состояний макромолекулы или макромолекулярного комплекса. Как правило, фиксация достигается за счет связывания лиганда — происходит выбор определенной конформации, соответствующей лиганду («индуцированное соответствие»), из двух или более равновесных конформаций. Химическое разрушение связанного лиганда, например гидролиз или, иногда, другие типы химической трансформации, освобождает конформацию от такого ограничения ее подвижности и позволяет ей снова переходить из одного альтернативного состояния в другое или находиться в равновесии между альтернативными состояниями.

Как уже отмечалось, малая масса тел, практическое отсутствие инерции, интенсивное броуновское движение, собственная тепловая подвижность, а следовательно, неспособность накапливать и сохранять механическую энергию, с одной стороны, и конформационная гибкость и отсутствие точной механики — с другой, делают маловероятным использование механических энергосиловых моторов с их механическими трансмиссиями и жесткой кинематикой в молекулярных машинах. На молекулярном уровне более вероятно использование тепловой подвижности макромолекул и их структурных блоков (модулей). Если рассматривать трансмиссионные передачи от двигателя к другим частям молекулярной машины, они могут быть описаны как конформационные переходы, возникающие вследствие утери одних внутримолекулярных или межмолекулярных контактов и появления альтернативных контактов (см. описание работы EF-Tu в подразд. 18.3.5.2), при том что сами перемещения происходят за счет тепловых движений. Исчезновение или уменьшение взаимного средства блоков молекулы или разных молекул ведет к диссоциации и вовлечению бывших партнеров в беспорядочное тепловое движение, а появление средства к другому блоку или молекуле отбирает партнера из беспорядочно движущихся блоков или молекул для нового контакта («ректификация» движений). Никаких специальных тянущих или, тем более, толкательных сил для конформационных перестроек макромолекул не требуется.

То же можно сказать и о двигателях молекулярных машин. В их основе лежат опять-таки тепловые движения и попеременно меняющееся средство машины к транспортному субстрату. В приложении к транслирующей рибосоме процессы

связывания лигандов и их внутририбосомной транслокации могут быть вполне адекватно описаны в терминах канализированных (анизотропных) диффузионных смещений. Таким образом, согласно развиваемой концепции молекулярных тепловых машин, именно тепловые движения должны использоваться для всех видов перемещений в транслирующей рибосоме. В то же время рибосома как транспортная молекулярная машина конвейерного типа должна обеспечивать процесс пошагового однонаправленного передвижения цепи мРНК и молекул тРНК сквозь себя или, что то же самое, собственное направленное пошаговое движение вдоль цепи мРНК с комплементарно связанными молекулами тРНК. Очевидно, что однонаправленность движения создается за счет ввода химической энергии, прежде всего в форме аминоацил-тРНК, а также, в случае факторкатализируемого процесса, ГТФ. Это и есть энергетическое питание рибосомы как молекулярной машины, обуславливающее строгую полярность всего процесса трансляции. Механистически полярность перемещения лигандов определяется просто разницей в средстве между предыдущим и последующим местами связывания по ходу конвейерной передачи. Лиганды каждый раз передвигаются от состояния слабого связывания к состоянию сильного связывания (*«weak to strong binding state transition»*). Так, в процессе бесфакторной трансляции аминоацил-тРНК поступает в транслирующую рибосому и связывается с *A*-участком рибосомы благодаря средству самого остатка тРНК к *A*-участку малой рибосомной субъединицы, ее антикодона — к кодону мРНК, установленному в *A*-участке, и ее аминоацелированного конца — к *a*-участку пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) большой рибосомной субъединицы (состояние *A/a*, *P/p*). Последующая реакция транспептидации приводит к исчезновению условий для прочного связывания обоих лигандов с участками *A/a* и *P/p*, и в то же время у их химически измененных 3'-концов появляется средство к *p*- и *e*-участкам соответственно. В результате этого происходит диссоциация 3'-концов тРНК от *a*- и *p*-участков ПТЦ и их реассоциация соответственно с *p*- и *e*-участками; устанавливается «гибридное» состояние *A/p*, *P/e*. «Гибридные» положения обеих тРНК, однако, оказываются неустойчивыми, и остаток тРНК молекулы пептидил-тРНК фиксируется *P*-участком малой рибосомной субъединицы в термодинамически более выгодном состоянии *P/p*, вытесняя слабо связанную деацелированную тРНК.

Во всех описанных процессах тепловые движения служат в качестве непосредственных импульсов, двигающих тРНК-лиганды и структурные блоки рРНК и создающих поле стерически разрешенных конформаций и положений на каждом этапе перехода от одного состояния к другому, в то время как отбор надлежащей конформации и положения определяется термодинамическими параметрами. Чередующиеся события присоединения-отсоединения и фиксации-освобождения, а вовсе не механически направляемые сдвиги за счет жестких сочленений и механической энергии, представляются наиболее вероятным способом работы транслирующей рибосомы, как и работы других молекулярных машин.

Таким образом, трансмиссионная передача в рибосоме как молекулярной машине — это сопряжение локальных химических изменений (связывание аминоацил-тРНК — транспептидация — освобождение деацелированной тРНК) с конформационными сдвигами в рибосоме, меняющими средство тРНК-связывающих участков к тРНК. Движителем являются тРНК-связывающие участки (*A*, *P*, *E*), чередующиеся изменения средства которых к тРНК обеспечивают однонаправленные перемещения тРНК от слабо связанного состояния к сильно связанному состоянию.

Изложенная схема конвейерного механизма работы рибосомы как молекулярной машины представляет собой версию так называемого «термально-храповикового» механизма (*thermal ratchet mechanism*, или *Brownian ratchet mechanism*), противопоставляемого энергосиловому механизму (*power-stroke mechanism*) макромашин (Фейнман и др., 1965; Вейл и Оосава, 1990; Остер и др., 1992; Янагида и др., 2007). В этой модели связывание лиганда или химическое превращение связанного лиганда являются энергетическими вкладами не прямо в качестве энергетического питания для механического движения — здесь все движения происходят вследствие тепловых флуктуаций и беспорядочного броуновского движения. Энергетический вклад состоит в том, что связывание лигандов и химические превращения (чаще всего, распад) связанных лигандов «ректифицируют» беспорядочные флуктуации — отбирают и фиксируют те конформации и положения, которые обеспечивают однонаправленность процесса. Другими словами, в рассматриваемой модели связывание лиганда и его химическое превращение играют роль «собачки» в храповиковом механизме, или «демона Максвелла» (*Maxwell's Demon*), энергетически подпитываемого этой химической реакцией.

Итак, согласно модели термально-храповикового механизма, молекулярные машины базируются на трех «китах»: 1) броуновском движении и собственной тепловой подвижности модулей машины; 2) лиганд-индуцируемой фиксации определенных положений модулей машины (отбор движений, «демон Максвелла»); 3) экзергонических (идущих с понижением свободной энергии) химических процессах превращения лигандов, катализируемых машиной. Для осуществления транспортных (конвейерных) функций требуются лишь периодические конформационные изменения макромолекулярного комплекса (молекулярной машины) и обусловленные ими определенные периодические изменения средства комплекса к транспортируемым молекулам (лигандам) или транспортному субстрату. В основном используются два типа энергетических вкладов, индуцирующих изменения конформации макромолекул и их средства к лигандам: 1) экзергоническая химическая реакция в макромолекулярном комплексе, приводящая к изменению контактов между элементами комплекса и/или в лигандсвязывающем центре; 2) присоединение и уход лиганда (субстрата, эффектора, фактора, продукта), индуцирующего изменение контактных поверхностей. В типичной ситуации присоединение лиганда фиксирует одну из наиболее вероятных альтернативных конформаций, находящихся в равновесии, а последующая химическая реакция разрушает лиганд и «освобождает» эту конформацию.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 18

- Артоболевский, И. И., и Левитский, Н. И. (1974). Машина. *Большая Советская Энциклопедия*. Том 15: 1584—1585. Изд-во «Советская Энциклопедия», Москва.
- Богданова, Е. С., Гаврилова, Л. П., Дворкин, Г. А., Киселев, Н. А. и Спириин, А. С. (1962). Изучение макромолекулярной структуры высокополимерной (рибосомальной) рибонуклеиновой кислоты из *Escherichia coli*. *Биохимия* 27: 387—402.
- Гонгадзе, Г. М., Гулков, А. Т., Бушуев, В. Н. и Сепетов, Н. Ф. (1984). Изменение внутримолекулярной подвижности белка L7/L12 в результате присоединения фактора элонгации G к рибосомам. *Доклады АН СССР* 279: 230—232.

- Спирин, А. С. (1968). О механизме работы рибосомы. Гипотеза смыкания-размыкания субчастиц. *Доклады АН СССР* **179**: 1467—1470.
- Спирин, А. С., Гаврилова, Л. П., Бреслер, С. Е. и Мосевичкий, М. И. (1959). Изучение макромолекулярной структуры инфекционной рибонуклеиновой кислоты из вируса табачной мозаики. *Биохимия* **24**: 938—947.
- Фейнман, Р., Лейтон, Р. и Сэндс, М. (1965). *Фейнмановские лекции по физике*. Том 4, гл. 46, с. 138—151. Изд-во «Мир», Москва.
- Финкельштейн, А. В. и Птицын, О. Б. (2005). *Физика белка*, 3-е издание. Изд-во «Книжный Дом Университет», Москва.
- Belitsina, N. V., and Spirin, A. S. (1970). Studies on the structure of ribosomes. IV. Participation of aminoacyl-tRNA and peptidyl-tRNA in the association of ribosomal subparticles. *J. Mol. Biol.* **52**: 45—55.
- Bretscher, M. S. (1968). Translocation in protein synthesis: a hybrid structure model. *Nature* **218**: 675—677.
- Chetverin, A. B., and Spirin, A. S. (1982). Bioenergetics and protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **683**: 153—179.
- Cordova, N. J., Ermentrout, B., and Oster, G. F. (1992). Dynamics of single-motor molecules: The thermal ratchet model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 339—343.
- Cornish, P. V., Ermolenko, D. N., Noller, H. F., and Ha, T. (2008). Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes. *Cell* **30**: 578—588.
- Ermolenko, D. N., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Spiegel, P. C., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007). Observation of intersubunit movement of the ribosome in solution using FRET. *J. Mol. Biol.* **370**: 530—540.
- Frank, J., and Agrawal, R. K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**: 318—322.
- Gabashvili, I. S., Agrawal, R. K., Spahn, R. A., Grassucci, R. A., Svergun, D. I., Frank, J., and Penczek, P. (2000). Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* **100**: 537—549.
- Gudkov, A. T., Gongadze, G. M., Bushuev, V. N., and Okon, M. S. (1982). Proton nuclear magnetic resonance study on the ribosomal protein L7/L12 in situ. *FEBS Letters* **138**: 229—232.
- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, A., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**: 679—688.
- Horan, L. H., and Noller, H. F. (2007). Intersubunit movement is required for ribosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 4881—4885.
- Julián, P., Konevega, A. L., Scheres, S. H. W., Lázaro, M., Gil, D., Wintermeyer, W., Rodnina, M., and Valle, M. (2008). Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 16924—16927.
- Korostelev, A., and Noller, H. F. (2007). Analysis of structural dynamics in the ribosome by TLS crystallographic refinement. *J. Mol. Biol.* **373**: 1058—1070.
- Moazed, D., and Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**: 142—148.
- Oefverstedt, L.-G., Zhang, K., Tapio, S., Skoglund, U., and Isaksson, L. A. (1994). Starvation in vivo for aminoacyl-tRNA increases the spatial separation between the two ribosomal subunits. *Cell* **79**: 629—638.
- Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., and Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**: 721—732.
- Purich, D. L. (2001). Enzyme catalysis: a new definition accounting for noncovalent substrate- and product-like states. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 417—421.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., and Cate, J. H. D. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**: 827—834.
- Serdyuk, I. N., Baranov, V. I., Tsalkova, T., Gulyamova, D., Pavlov, M., Spirin, A. S., and May, R. L. (1992). Structural dynamics of translating ribosomes. *Biochimie* **74**: 299—306.

- Spiegel, P. C., Ermolenko, D. N., and Noller, H. E. (2007). Elongation factor G stabilizes the hybrid-state conformation of the 70S ribosome. *RNA* **13**: 1473–1482.
- Spirin, A. S. (1960). On macromolecular structure of native high-polymer ribonucleic acid in solution. *J. Mol. Biol.* **2**: 436–446.
- Spirin, A. S. (1969). A model of the functioning ribosome: Locking and unlocking of the ribosome subparticles. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 197–207.
- Spirin, A. S. (1978). Energetics of the ribosome. *Progress in Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **21**: 39–62.
- Spirin, A. S. (1985). Ribosomal translocation: Facts and models. *Progress Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **32**: 75–114.
- Spirin, A. S. (2002). Ribosome as a molecular machine. *FEBS Letters* **514**: 2–10.
- Spirin, A. S. (2004). The ribosome as an RNA-based molecular machine. *RNA Biology* **1**: 3–9.
- Spirin, A. S., Baranov, V. I., Polubesov, G. S., and Serdyuk, I. N. (1987). Translocation makes the ribosome less compact. *J. Mol. Biol.* **194**: 119–128.
- Vale, R. D., and Oosawa, F. (1990). Protein motors and Maxwell's demons: does mechanochemical transduction involve a thermal ratchet? *Adv. Biophys.* **26**: 97–134.
- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003). Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**: 123–134.
- Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S. M., Sengupta, J., Nielsen, R. C., Nissen, P., Harvey, S. C., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003). Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nature Struct. Biol.* **10**: 899–906.
- Yanagida, T., Ueda, M., Murata, T., Esaki, S., and Ishii, Y. (2007). Brownian motion, fluctuation and life. *Biosystems* **88**: 228–242.

Предисловие.....	3
ЧАСТЬ I. ВВОДНАЯ	
Глава 1. Мир РНК и биосинтез белков.....	5
1.1. Центральная догма молекулярной биологии.....	5
1.2. Кодированные и некодирующие РНК.....	7
1.3. Общая схема биосинтеза белков.....	11
1.4. Принципы макромолекулярной структуры РНК.....	13
1.4.1. Вторичная структура.....	13
1.4.2. Третичная структура.....	18
1.5. Мир РНК и происхождение жизни.....	23
1.5.1. Многофункциональность РНК.....	23
1.5.2. Гипотеза о древнем мире РНК.....	26
1.5.3. Компарментализация как условие биологической эволюции.....	28
1.5.4. Эволюция древнего мира РНК путем «систематического экспоненциального обогащения».....	30
Литература к главе 1.....	34
Глава 2. Информационная РНК и генетический код.....	37
2.1. Расшифровка генетического кода.....	37
2.2. Особенности генетического кода.....	42
2.3. Структура мРНК.....	44
2.3.1. Первичная структура и функциональные области цепи мРНК.....	44
2.3.2. Трехмерная структура мРНК.....	47
2.4. Информационные рибонуклеопротеидные частицы высших эукариот (информосомы, или мРНП).....	48
2.4.1. Особенности структуры белков УВ и РАВР.....	50
2.4.2. Изменение соотношения двух мажорных белков мРНП, ассоциированных с мРНК, при переходе мРНК из нетранслируемого в транслируемое состояние.....	52
2.4.3. Влияние белка УВ на конформацию мРНК-белковых комплексов.....	53
2.4.4. Роль белков УВ и РАВР в обеспечении стабильности мРНК.....	54
Литература к главе 2.....	55
Глава 3. Транспортная РНК и аминоксил-тРНК-синтетазы.....	57
3.1. Открытие.....	57
3.2. Структура тРНК.....	58
3.2.1. Первичная структура.....	58
3.2.2. Вторичная структура.....	62
3.2.3. Третичная структура.....	64
3.3. Аминоксил-тРНК-синтетазы.....	68
3.4. Аминоксилирование тРНК.....	72

3.5. Специфичность по отношению к тРНК.....	76
3.5.1. Специфичность по отношению к аминокислоте.....	76
3.5.2. Специфичность по отношению к тРНК.....	77
3.5.3. Специфические модификации аминокислотных остатков после аминоацилирования.....	79
Литература к главе 3.....	80
Глава 4. Рибосомы и трансляция.....	82
4.1. Первые наблюдения.....	82
4.2. Локализация рибосом в клетке.....	83
4.3. Рибосомы прокариот и эукариот.....	84
4.4. Полирибосомы.....	86
4.5. Стадии трансляции: инициация, элонгация и терминация.....	90
4.6. Химические реакции и суммарный энергетический баланс биосинтеза белка.....	90
4.7. Бесклеточные системы трансляции.....	92
Литература к главе 4.....	96
ЧАСТЬ II. СТРУКТУРА РИБОСОМЫ	
Глава 5. Морфология рибосомы.....	98
5.1. Размер, внешний вид и подразделение на субъединицы.....	98
5.2. Малая субъединица.....	100
5.3. Большая субъединица.....	102
5.4. Ассоциация субъединиц в полную рибосому.....	104
5.5. Структура рибосомы с низким разрешением.....	104
5.6. Структура рибосомы с атомным разрешением.....	107
Литература к главе 5.....	107
Глава 6. Рибосомная РНК.....	109
6.1. Введение.....	109
6.2. Типы рибосомных РНК и их первичная структура.....	109
6.2.1. РНК малой рибосомной субъединицы.....	110
6.2.2. РНК большой рибосомной субъединицы.....	110
6.2.3. Модифицированные нуклеозиды рибосомных РНК.....	111
6.3. Вторичная структура рибосомных РНК.....	113
6.3.1. Основные принципы.....	113
6.3.2. Характерные структурные мотивы.....	116
6.3.2.1. Двуспиральные участки ближнего порядка («шпильчатые» спирали).....	116
6.3.2.2. Торцевые петли.....	118
6.3.2.3. Псевдоузлы.....	118
6.3.2.4. Одноязычные спирали.....	119
6.4. Конформационная подвижность и компактное сворачивание рибосомных РНК.....	119
6.4.1. Конформационная подвижность изолированных рибосомных РНК.....	119
6.4.2. Специфическое сворачивание изолированных рибосомных РНК в компактные рибосомоподобные структуры.....	120
6.4.3. Разворачивание компактных рибосомных частиц.....	122
6.5. Третичная структура рибосомных РНК.....	123
6.5.1. 16S рибосомная РНК.....	123
6.5.1.1. Дальние комплементарные взаимодействия и подразделение на домены.....	123
6.5.1.2. Коаксиальный стэкинг спиралей.....	124
6.5.1.3. Боковые спираль-спиральные взаимодействия.....	124
6.5.1.4. Перпендикулярные спираль-петлевые взаимодействия.....	125

6.5.1.5. Общий вид третичной структуры.....	125
6.5.2. 23S рибосомная РНК.....	127
6.5.2.1. Общий черешок и структурные домены.....	127
6.5.2.2. Внутридоменные спираль-спиральные взаимодействия.....	128
6.5.2.3. Междоменные взаимодействия.....	129
6.5.2.4. Общий вид третичной структуры.....	129
6.5.3. 5S рибосомная РНК.....	129
Литература к главе 6.....	131
Глава 7. Рибосомные белки и четвертичная структура рибосомы.....	133
7.1. Разнообразие и номенклатура рибосомных белков.....	133
7.2. Первичные структуры белков.....	137
7.3. Пространственные структуры белков.....	138
7.4. Белковые комплексы.....	141
7.5. Взаимодействия белков с рибосомной РНК.....	142
7.6. Разборка и самосборка рибосомных частиц.....	143
7.6.1. Разборка («раздевание»).....	143
7.6.2. Сборка белков на РНК (реконструкция).....	146
7.7. Периферическая локализация белков и их топография.....	148
7.7.1. Белковая периферия и ядро РНК.....	148
7.7.2. Идентификация соседствующих белков.....	150
7.7.3. Иммуноэлектронно-микроскопическая идентификация белков на поверхности рибосомных субъединиц.....	151
7.7.4. Рентгеноструктурный анализ рибосомных субъединиц.....	153
Литература к главе 7.....	156
ЧАСТЬ III. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ РИБОСОМЫ	
Глава 8. Функциональные активности и функциональные участки рибосомы.....	160
8.1. Рабочий цикл рибосомы.....	160
8.2. Связывание, удержание и скольжение мРНК (мРНК-связывающий участок на малой субъединице).....	164
8.3. Катализ реакции образования пептидной связи (пептидилтрансферазный центр на большой субъединице).....	167
8.4. ГТФ-зависимое связывание факторов трансляции (участок связывания белковых факторов на большой субъединице).....	173
8.5. Связывание аминоацил-тРНК и удержание пептидил-тРНК (тРНК-связывающие центры в межсубъединичном пространстве).....	178
8.5.1. А-участок.....	180
8.5.2. Р-участок.....	182
8.5.3. Е-участок: участок выхода деацилированной тРНК.....	183
8.5.4. Промежуточные, или «гибридные», положения тРНК в транслирующей рибосоме.....	185
8.6. Перемещения лигандов: функция транслокации.....	187
Литература к главе 8.....	187
Глава 9. Элонгационный цикл, стадия I: связывание аминоацил-тРНК.....	189
9.1. Кодон-антикодонное взаимодействие.....	189
9.1.1. Адаптерная гипотеза и ее доказательство.....	189
9.1.2. Концепция комплементарного антикодона.....	190
9.1.3. Нестрогое соответствие при кодон-антикодонном спаривании (wobble- гипотеза Крика).....	190

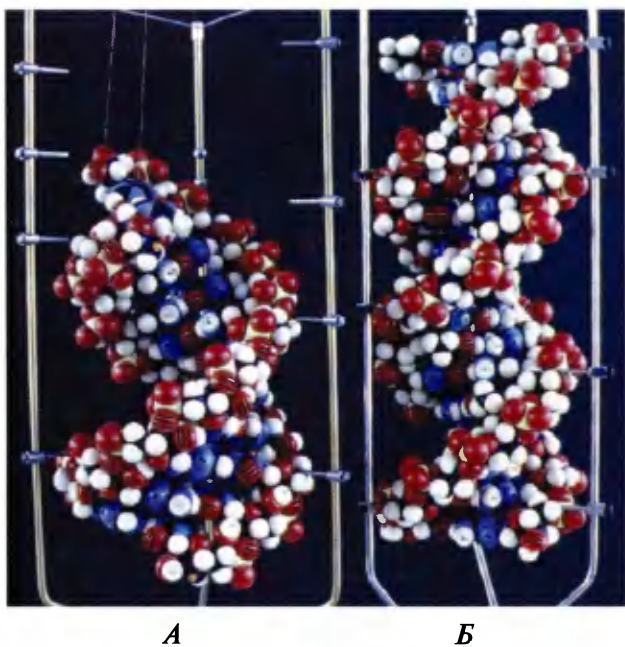
9.1.4. Уточнения правил нестрогого соответствия.....	194
9.1.5. Стереохимия кодон-антикодонного спаривания.....	195
9.1.6. Смыкание структурных блоков малой рибосомной субъединицы при кодон-антикодонном взаимодействии.....	196
9.2. Участие фактора элонгации 1 (EF-Tu или eEF1A) в связывании аминоацил-тРНК.....	197
9.2.1. EF1A и его взаимодействия.....	197
9.2.2. Связывание тройственного комплекса с рибосомой.....	200
9.2.3. Роль ГТФ и его гидролиза в катализе связывания аминоацил-тРНК.....	203
9.3. Ингибиторы связывания аминоацил-тРНК.....	205
9.3.1. Тетрациклины.....	205
9.3.2. Аминогликозиды.....	207
9.3.3. Некоторые не прямые ингибиторы.....	211
9.4. Ложное кодирование.....	213
9.4.1. Ложное считывание поли(U).....	214
9.4.2. Прочитывание («текучесть») стоп-кодонов.....	215
9.4.3. Основные типы некорректного спаривания.....	215
9.4.4. Факторы, вносящие вклад в ложное кодирование.....	216
9.4.5. Уровень ложного кодирования <i>in vivo</i> в нормальных условиях.....	217
9.4.6. Кинетические механизмы ложного кодирования и его коррекции.....	219
9.5. Общая схема последовательности событий при связывании аминоацил-тРНК с рибосомой.....	221
9.5.1. Сканирование (перебор) тРНК (стадия 1).....	221
9.5.2. Узнавание антикодона (стадия 2).....	223
9.5.3. Гидролиз ГТФ (стадия 3).....	223
9.5.4. Освобождение EF-Tu (стадия 4).....	224
Литература к главе 9.....	225
Глава 10. Элонгационный цикл, стадия II: транспептидация (образование пептидной связи).....	227
10.1. Химия реакции.....	227
10.2. Стереохимическое рассмотрение реакции.....	229
10.3. Структурные основы катализа транспептидации.....	232
10.4. Спонтанное посттранспептидационное смещение продуктов транспептидации как предпосылка транслокации.....	234
10.5. Энергетический баланс реакции.....	236
10.6. Ингибиторы.....	237
10.6.1. Хлорамфеникол.....	237
10.6.2. Линкозамиды.....	239
10.6.3. 4-Аминогексозопиримидиннуклеозидные антибиотики.....	239
10.6.4. Макролиды.....	240
10.6.5. Стрептограмин А.....	241
10.6.6. Стрептограмин В.....	241
10.6.7. Спарсомидин.....	243
10.6.8. Анизомидин.....	244
Литература к главе 10.....	244
Глава 11. Элонгационный цикл, стадия III: транслокация.....	246
11.1. Определения и экспериментальные термины.....	246
11.2. Участие фактора элонгации (EF-G или eEF2) в транслокации.....	248
11.2.1. Структура белка EF2.....	248
11.2.2. Взаимодействия EF2.....	250
11.2.3. Транслокационные интермедиаты.....	251

11.2.4. Роль ГТФ и его гидролиза в катализе транслокации	253
11.2.5. Факторзависимый элонгационный цикл	254
11.3. Бесфакторная («неэнзиматическая») транслокация.....	254
11.4. Передвижения матрицы при транслокации.....	257
11.4.1. Триплетная транслокация.....	257
11.4.2. Нетриплетная транслокация (транслокационные ошибки)	258
11.4.2.1. Сдвиг рамки на стадии связывания аминоксил-тРНК.....	259
11.4.2.2. Сдвиг рамки на стадии транслокации	260
11.4.3. Рибосомные «прыжки».....	263
11.5. Механика и энергетика транслокации.....	268
11.5.1. Механика.....	268
11.5.2. Энергетика.....	269
11.6. Ингибиторы транслокации	270
11.6.1. Аминогликозиды и аминоциклитолы	270
11.6.2. Виомицин (туберактиномицин)	271
11.6.3. Тиострептог.....	273
11.6.4. Фусовая кислота.....	273
11.6.5. Глутаримиды.....	274
11.6.6. Неспецифические агенты, ингибирующие транслокацию	274
11.7. Резюме: последовательность событий и молекулярные механизмы	275
Литература к главе 11.....	277
Глава 12. Скорость элонгации и ее модуляция	279
12.1. Скорость элонгации у прокариот и эукариот.....	279
12.1.1. «Транзитное время».....	279
12.1.2. Средняя скорость элонгации и ее вариации.....	280
12.1.3. Профиль полирибосом	281
12.2. Неравномерность элонгации	282
12.2.1. Трансляционные паузы.....	282
12.2.2. Модулирующие кодоны.....	283
12.2.3. Структурные барьеры на мРНК	285
12.2.4. Новосинтезируемые пептиды, ингибирующие рибосому.....	285
12.3. Избирательная регуляция скорости элонгации на специфических мРНК.....	287
12.4. Тотальная регуляция элонгации.....	288
12.4.1. Общие изменения скорости элонгации	288
12.4.2. Фосфорилирование фактора элонгации 2	289
12.4.3. Модификации фактора элонгации 1	290
12.5. Белковые токсины, воздействующие на элонгацию	290
12.5.1. Дифтерийный токсин	291
12.5.2. Шига-токсин.....	292
12.5.3. Альфа-сарцин	293
12.5.4. Растительные белковые токсины.....	293
12.5.5. Искусственные химерные токсины.....	294
Литература к главе 12	295
Глава 13. Терминация трансляции.....	298
13.1. Кодоны терминации	298
13.2. Белковые факторы терминации	300
13.2.1. Факторы терминации класса 1.....	301
13.2.2. Факторы терминации класса 2	303
13.2.3. Фактор «повторного использования рибосомы», или RRF (RF4).....	304
13.3. Связывание факторов терминации с рибосомой.....	305
13.4. Гидролиз пептидил-тРНК.....	307

13.5. Эвакуация эвакуированной тРНК	308
13.6. Общий сценарий последовательности событий в процессе терминации	310
Литература к главе 13	312
Глава 14. Инициация трансляции	315
14.1. Общие принципы	315
14.1.1. Значение стадии инициации	315
14.1.2. Прокариотический и эукариотический способы инициации	316
14.1.3. Основные участники механизма инициации	316
14.1.4. Этапы инициации	319
14.2. Инициация у прокариот	321
14.2.1. Основные особенности прокариотической инициации	321
14.2.2. Участок связывания с рибосомой на мРНК и кодон инициации	322
14.2.3. Прокариотическая инициаторная тРНК	326
14.2.4. Прокариотические факторы инициации	329
14.2.5. Последовательность событий инициации трансляции	330
14.3. Инициация у эукариот	333
14.3.1. Особенности эукариотических мРНК	333
14.3.2. Кэп-структура и инициаторные кодоны	335
14.3.3. Внутренние участки инициации	337
14.3.4. Эукариотическая инициаторная тРНК	339
14.3.5. Рибосомные факторы инициации	342
14.3.6. мРНК-связывающие факторы инициации	345
14.3.6.1. Кэп-связывающий комплекс	345
14.3.6.2. РНК-хеликазный комплекс	346
14.3.7. Факторы инициации, участвующие в формировании 80S рибосом	349
14.3.8. Дополнительные IRES-связывающие факторы и факторнезависимые IRES	349
14.3.8.1. ITAF	349
14.3.8.2. eIF-независимые IRES	350
14.3.9. 3'-Концевые усилители инициации	352
14.3.9.1. Поли(А)-«хвост»	352
14.3.9.2. 3'-Концевая шпилька гистоновой мРНК	353
14.3.9.3. Структурированные домены 3'-нетранслируемой области РНК растительных вирусов	354
14.3.9.4. Концевой тРНК-подобный домен РНК растительных вирусов	355
14.3.10. Последовательность событий канонической инициации трансляции	356
Литература к главе 14	357
Глава 15. Регуляция трансляции у прокариот	360
15.1. Общие положения	360
15.2. Дискриминация мРНК	361
15.3. Трансляционное сопряжение	363
15.3.1. Инициация, индуцированная трансляцией предыдущего цистрона	364
15.3.2. Последовательная трансляция полицистронных матриц путем реинициации	368
15.4. Трансляционная репрессия	370
15.4.1. Регуляция трансляции РНК бактериофага MS2	371
15.4.2. Регуляция трансляции мРНК рибосомных белков	376
15.4.3. Трансляционная авторегуляция синтеза треонил-тРНК-синтетазы	384
15.5. «Рибопереключения»	386
15.6. Антисмысловое блокирование	391
Литература к главе 15	393

Глава 16. Регуляция трансляции у эукариот	396
16.1. Значение регуляции трансляции у эукариот	396
16.2. Тотальная регуляция трансляции путем модификации факторов инициации.....	397
16.2.1. Фосфорилирование eIF2	397
16.2.2. Фосфорилирование eIF4E и 4E-BP	400
16.3. Дискриминация мРНК иницирующими рибосомными частицами и факторами инициации	401
16.3.1. Дискриминация мРНК через средство к рибосомной частице.....	401
16.3.2. Дискриминация мРНК посредством мРНК-связывающих факторов инициации.....	402
16.3.3. Модуляция трансляционной дискриминации при тотальных изменениях скорости элонгации или инициации	404
16.4. Регуляция инициации короткими открытыми рамками считывания (uORF).....	406
16.4.1. Ингибирование реинициации, независимое от нуклеотидной последовательности предшествующей ORF	407
16.4.2. Ингибирование реинициации, зависимое от нуклеотидной последовательности предшествующей ORF	410
16.4.3. ORF-зависимое шунтирование мРНК сканирующими рибосомами	411
16.5. Трансляционная репрессия	412
16.5.1. Репрессия путем запрещения посадки иницирующего рибосомного комплекса на мРНК.....	413
16.5.1.1. Регуляция трансляции ферритиновой мРНК	413
16.5.1.2. Регуляция трансляции мРНК орнитиндекарбоксилазы и <i>c-тус</i> мРНК.....	414
16.5.2. Репрессия путем стабилизации структурного барьера на пути сканирующего рибосомного комплекса	416
16.6. Маскирование мРНК.....	416
16.6.1. Маскированные мРНК в ооцитах и сперматоцитах	417
16.6.2. Демаскирование мРНК в раннем эмбриогенезе	419
16.6.2.1. Ранний эмбриогенез лягушки.....	419
16.6.2.2. Ранний эмбриогенез мухи	421
16.6.3. Маскирование и демаскирование мРНК в процессе клеточной дифференцировки.....	424
16.6.4. Участие микроРНК в маскировании мРНК.....	425
16.6.5. Гипотетическая модель маскирования мРНК	428
16.7. Эволюция основных механизмов регуляции трансляции	430
Литература к главе 16	431
Глава 17. Котрансляционное сворачивание и трансмембранный транспорт белков	434
17.1. Вклад рибосомы в сворачивание белков	434
17.1.1. Стартовая конформация в пептидилтрансферазном центре	434
17.1.2. Котрансляционное сворачивание растущего полипептида на рибосоме	434
17.1.3. Туннель внутри рибосомы или желоб на ее поверхности для растущего полипептида?	437
17.1.4. Молекулярные шапероны, взаимодействующие с растущей полипептидной цепью на рибосоме	439
17.1.5. Синтез белков мембраносвязанными рибосомами.....	441
17.2. Взаимодействие транслирующих рибосом с мембранами	443
17.2.1. Ранние наблюдения.....	443
17.2.2. Первичные взаимодействия растущего пептида.....	443
17.2.3. Сигнальные аминокислотные последовательности.....	444
	495

17.2.4. Взаимодействие транслирующей рибосомы, содержащей растущую цепь, с SRP	447
17.2.5. Взаимодействие комплекса рибосома/растущая цепь/SRP с рецептором SRP на мембране	449
17.3. Котрансляционная трансмембранная транслокация растущих полипептидных цепей	451
17.3.1. Трансмембранный пептидпроводящий канал	451
17.3.2. Транспорт растущего полипептида через трансмембранный канал	453
17.3.3. Встраивание растущей полипептидной цепи в мембрану	455
17.4. Котрансляционные ковалентные модификации и сворачивание растущей полипептидной цепи в просвете эндоплазматического ретикулума	457
17.5. Альтернативные пути трансмембранного транспорта новосинтезированных белков	458
Литература к главе 17	460
Глава 18. Заключение. Принципы структуры и функции рибосом	463
18.1. Основные принципы структуры рибосомы	463
18.1.1. Подразделение на две неравные субчастицы	463
18.1.2. Самоукладка рибосомной РНК в компактную структуру	463
18.1.3. Сборка рибосомных белков на компактной РНК	464
18.2. Основные принципы функционирования рибосомы	465
18.2.1. Структурные карманы для функциональных центров	465
18.2.2. Разделение функций между рибосомными субъединицами	466
18.2.2.1. Генетическая функция малой субъединицы	466
18.2.2.2. Каталитическая функция большой субъединицы	467
18.3. Рибосома как молекулярная машина	468
18.3.1. Определения	468
18.3.2. Крупноблочная подвижность	469
18.3.2.1. Подвижность структурных блоков малой рибосомной субъединицы	470
18.3.2.2. Подвижность структурных блоков большой рибосомной субъединицы	471
18.3.2.3. Взаимная подвижность рибосомных субъединиц	472
18.3.3. Концепция смыкания-размыкания: «открытые» (релаксированные) и «закрытые» (фиксированные) конформации	474
18.3.4. Переходные конформационные состояния и ГТФ-зависимый катализ конформационных переходов	477
18.3.5. Рибосома как изотермическая тепловая машина с конформационным «храповиком» и химической «собачкой»	479
18.3.5.1. Особенности молекулярных машин	479
18.3.5.2. Двигатель рибосомы как молекулярной машины	480
18.3.5.3. Дополнительные двигатели полного элонгационного цикла	483
18.3.5.4. Трансмиссия и движитель молекулярной машины	483
18.3.5.5. «Храповик» и «собачка»	486
Литература к главе 18	486



A

B

Рис. 1.1. Структурные атомные модели двойных спиралей ДНК.

A: А-форма.

B: В-форма

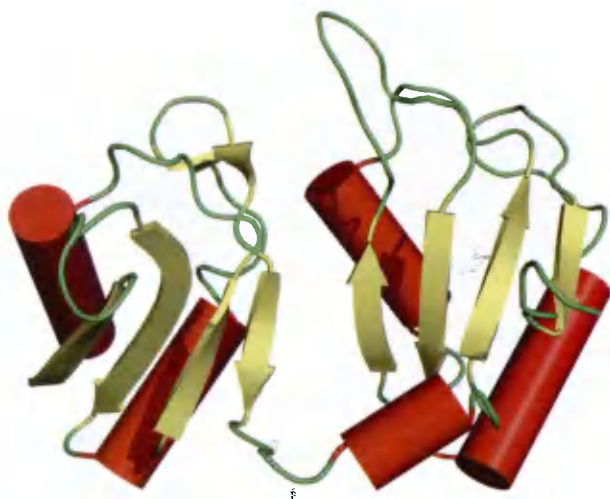
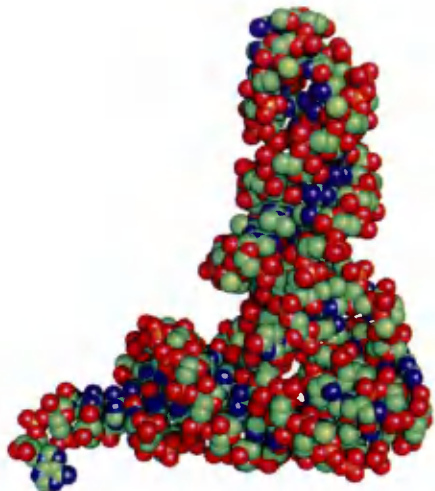
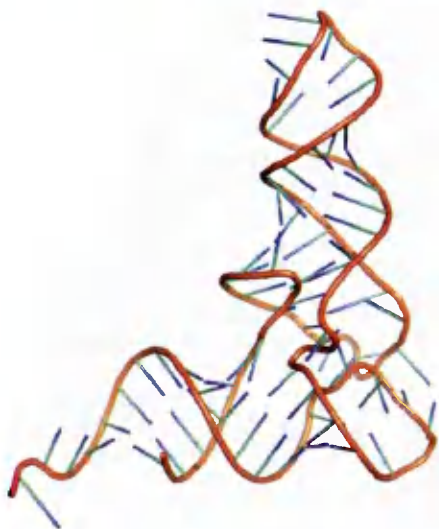


Рис. 2.1. Пространственная структура пары доменов RRM1 + RRM2 поли(А)-связывающего человеческого белка PABP1, объединенный β -слой которых (β -тяжи выделены желтым цветом) связывает октануклеотидный участок цепи поли(А).



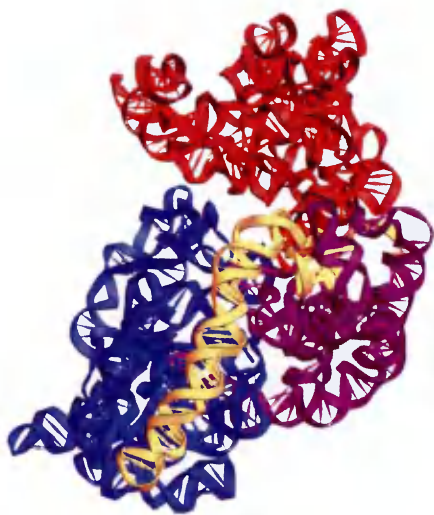
A



B



Рис. 3.1. Атомная (*A*) и скелетная (*B*) модели третичной структуры дрожжевой фенилаланиновой тРНК в двух проекциях по данным рентгеноструктурного анализа.



A



B

Рис. 6.1. Модели третичных структур 16S (*A*) и 23S (*B*) рРНК по данным рентгеноструктурного анализа (см. рис. 6.6 и 6.7).

A: домен I – синий; домен II – малиновый; домен III – красный; минорный 3'-концевой домен (шпильки h44 и h45) – желтый.

B: домен I – темно-синий; домен II – цвета морской волны; домен III – зеленый; домен IV – желтый; домен V – красный; домен VI – малиновый; 5S РНК – голубая, на вершучке центрального выступа.

Воспроизведено из Yusupov et al. (2001) *Science* **292**: 883–896, с разрешения авторов и издательства

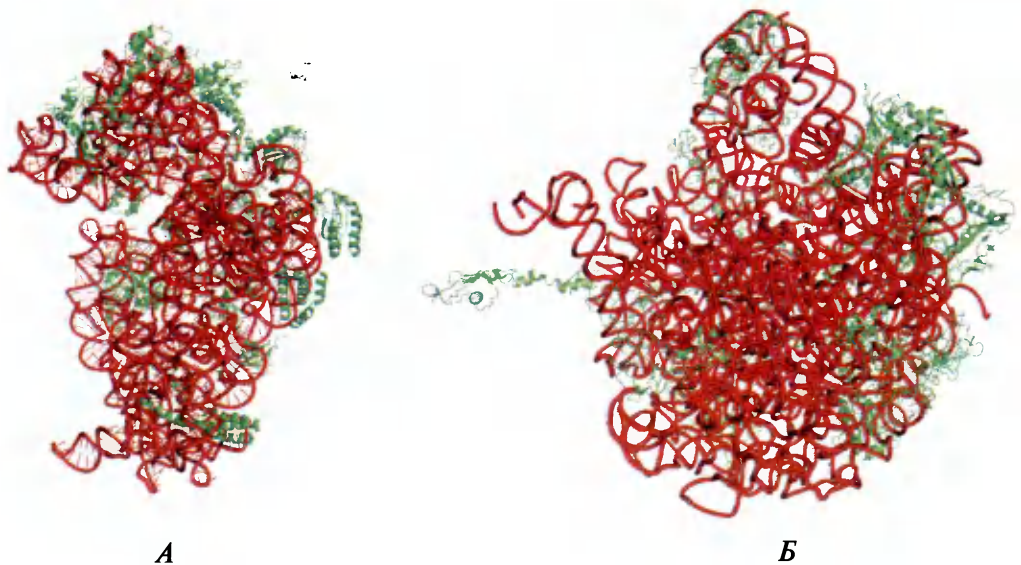


Рис. 7.1. Четвертичные структуры 30S (*А*) и 50S (*Б*) рибосомных субъединиц *Escherichia coli* по данным рентгеноструктурного анализа с разрешением 3,5 Å. Вид со стороны их контактирующих (обращенных друг к другу) поверхностей.

Красным выделена рибосомная РНК; зеленым – белки.

PDB ID 1VS5, 1VS6. Schuwirth et al. (2005) *Science* 310: 827–834

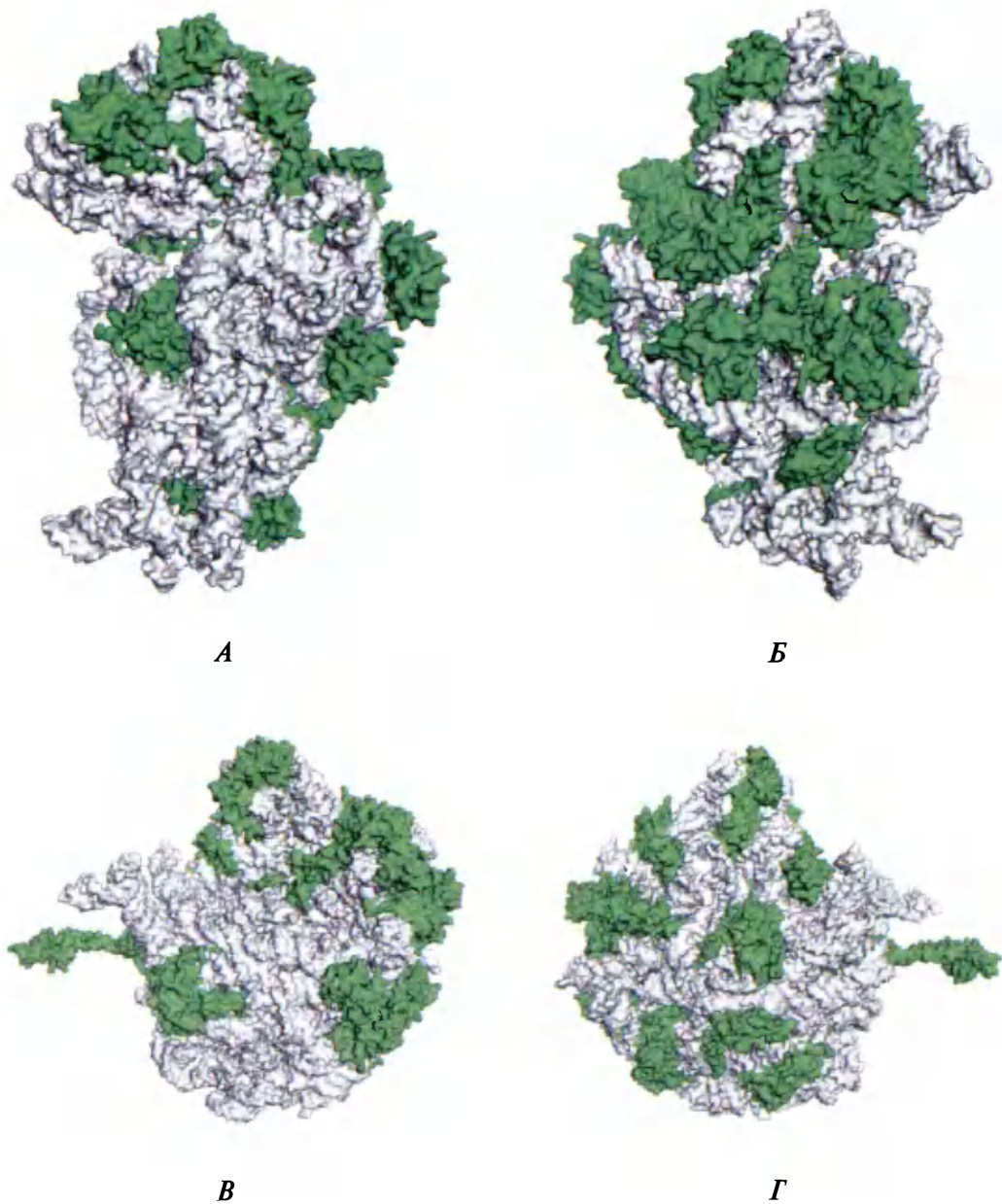


Рис. 7.П. Расположение рибосомных белков на контактирующей (*A*, *B*) и внешней (*B*, *Г*) поверхностях 30S (*A*, *B*) и 50S (*B*, *Г*) рибосомных субъединиц *Escherichia coli* по данным рентгеноструктурного анализа.

Поверхность РНК — серая, белков — зеленая.

PDB ID 1VS6, 1VS7. Schuwirth et al. (2005) *Science* **310**: 827–834

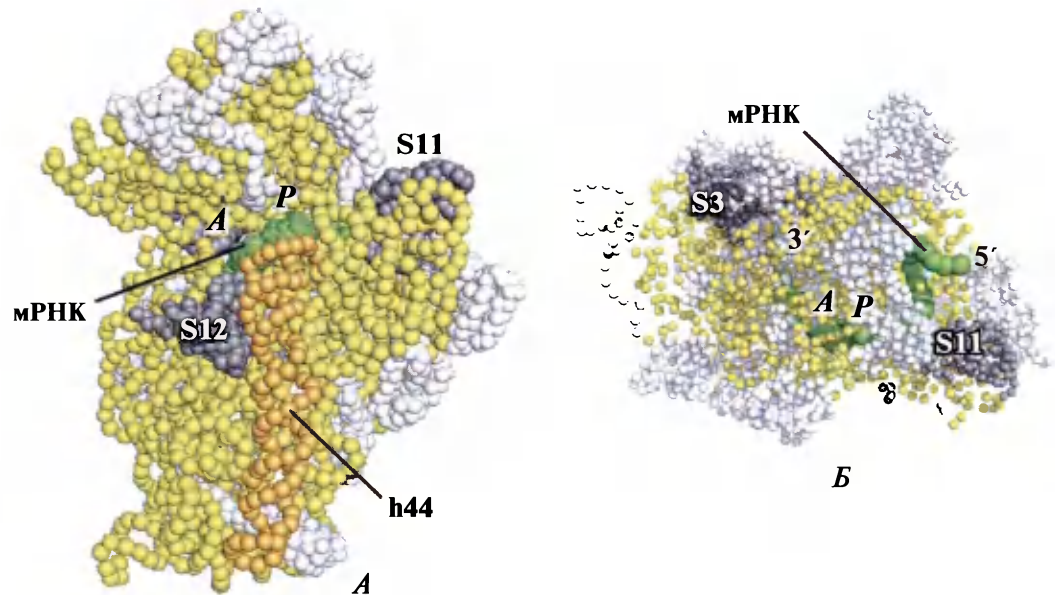


Рис. 8.1. Локализация цепи мРНК на «шее» 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

А: контактирующая (обращенная к 50S субъединице) поверхность 30S субъединицы в комплексе с короткой мРНК.

Б: 30S субъединица развернута своей головкой к зрителю и контактирующей стороной вниз.

PDB ID 1JGO. Yusupova et al.(2001) *Cell* **106**: 233–241

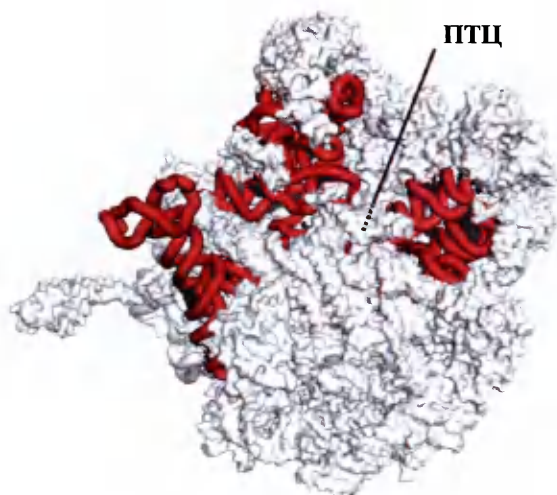


Рис. 8.11. Контактная (обращенная к 30S рибосомной субъединице) поверхность 50S рибосомной субъединицы с доменом V 23S рРНК, выделенным красным цветом.

Указан район пептидилтрансферазного центра (ПТЦ). Видно, что ПТЦ (конец пунктирной линии) прикрыт сверху от непосредственного контакта с 30S субъединицей, находясь в борозде под спиралью домена IV.

PDB ID 1VS6. Schuwirth et al. (2005) *Science* **310**: 827–834

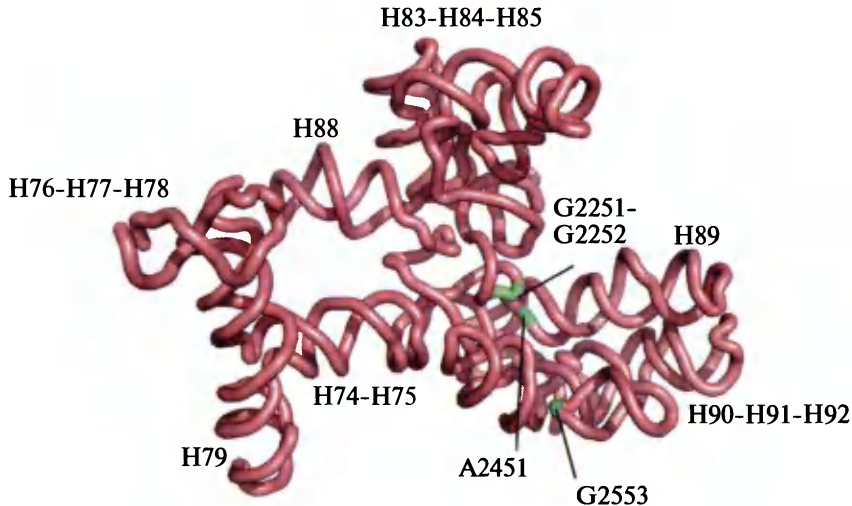


Рис. 8.III. Третичная структура домена V 23S рРНК по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 1VS6. Schuwirth et al. (2005) *Science* 310: 827–834

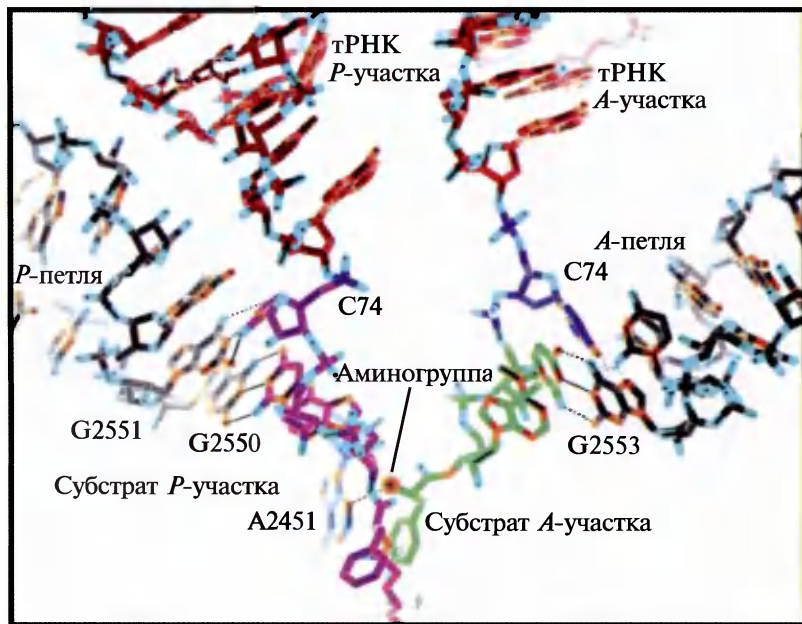


Рис. 8.IV. Расположение аминоконцов молекул аминоксил-тРНК и пептидил-тРНК в *a*- и *p*-участках пептидилтрансферазного центра (ПТЦ).

Воспроизведено из Hansen et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11670–11675, с разрешения авторов и издательства

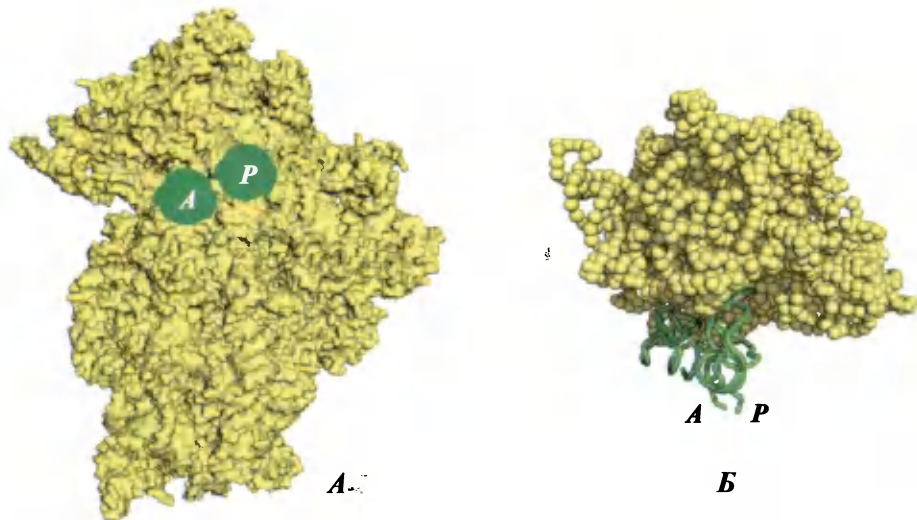


Рис. 8.V. Локализация *A*- и *P*-участков связывания тРНК на контактирующей поверхности 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

А: 30S субъединица расположена своей контактирующей стороной к зрителю, и две молекулы тРНК, связанные своими антикодонами с кодонами мРНК, обращены к зрителю своими акцепторными концами.

Б: 30S субъединица с двумя молекулами тРНК, связанными своими антикодонами с кодонами мРНК, проходящей в шейной борозде субъединицы, развернута своей головкой к зрителю.

PDB ID 2J00. Selmer et al. (2006) *Science* **313**: 1935–1942

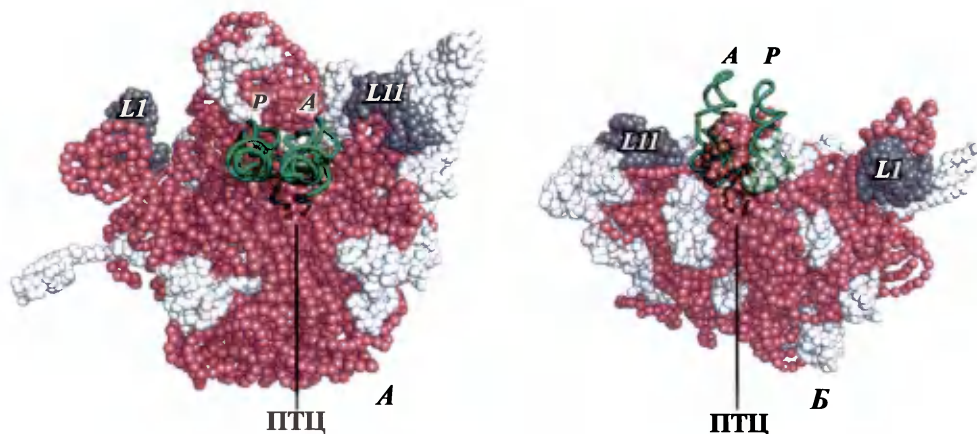


Рис. 8.VI. Локализация *A*- и *P*-участков связывания тРНК на контактирующей поверхности 50S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

А: 50S субъединица обращена своей контактирующей стороной к зрителю, и две молекулы тРНК, связанные своими акцепторными концами в районе ПТЦ, направлены на зрителя своими антикодонами шпильками.

Б: 50S субъединица с двумя молекулами тРНК, связанными своими акцепторными концами с ПТЦ в глубокой борозде субъединицы, развернута своим центральным выступом (головкой) к зрителю и контактирующей поверхностью вверх. Молекулы тРНК *A*- и *P*-участков обращены антикодонами шпильками вверх.

PDB ID 2J01. Selmer et al. (2006) *Science* **313**: 1935–1942

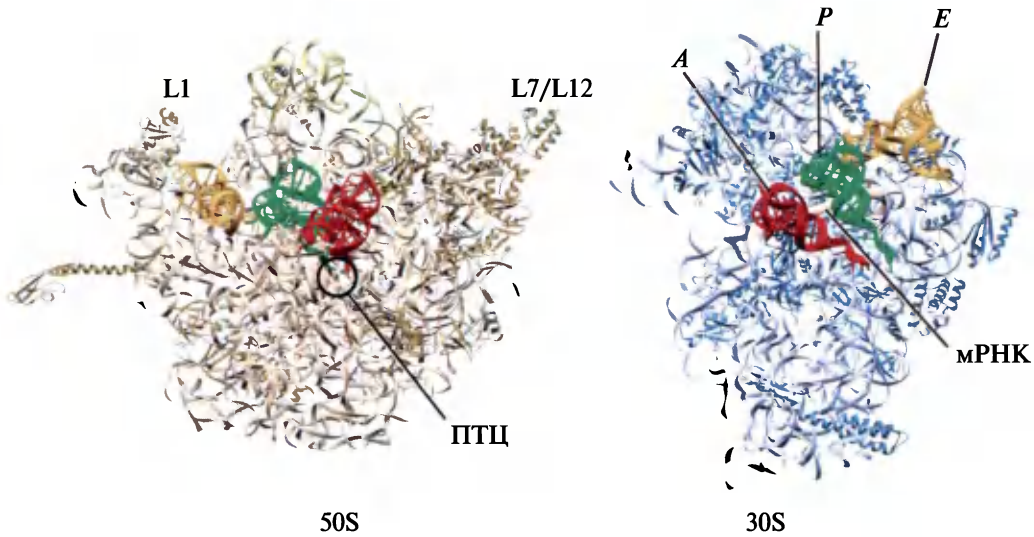


Рис. 8.VII. Расположение молекул тРНК в *A*-, *P*- и *E*-участках на контактирующих поверхностях каркасов рибосомных РНК большой и малой субъединиц по данным рентгеноструктурного анализа.

Воспроизведено из Ramakrishnan (2002) *Cell* **108**: 557–572, с разрешения автора и издательства

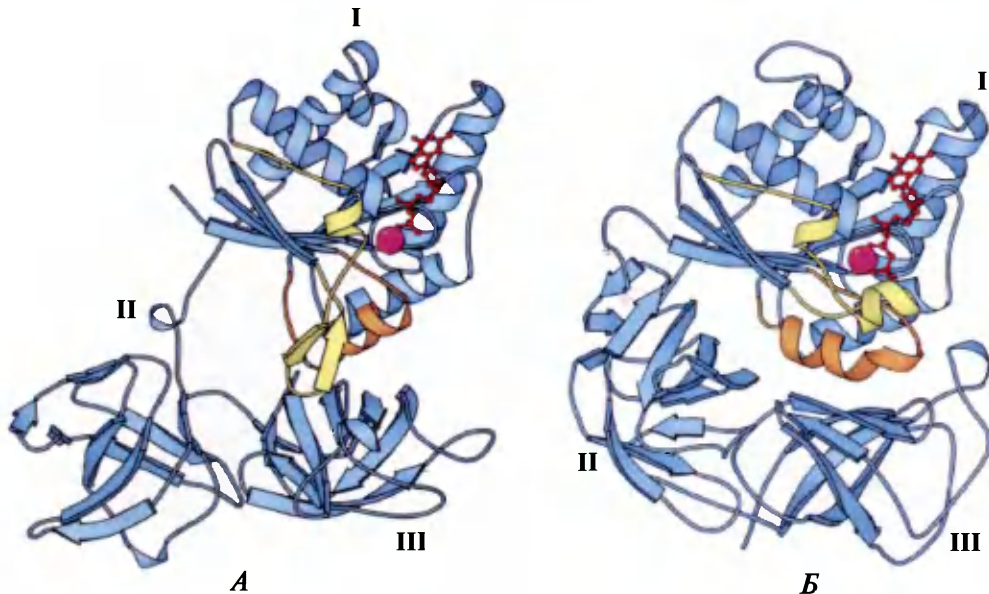


Рис. 9.1. EF-Tu *E. coli* в комплексе с ГДФ (**А**) и EF-Tu *T. thermophilus* в комплексе с GMP-PNP (**Б**) по данным рентгеноструктурного анализа.

Красным кружком обозначен связанный ион магния.
Abel et al. (1996) *Structure* 4: 1153–1159



Рис. 9.2. Смыкание блоков 30S рибосомной субъединицы при кодонзависимом связывании аминоктил-тРНК в А-участке по данным рентгеноструктурного анализа.

В эксперименте к 30S рибосомной субъединице, содержащей гексануклеотид в качестве матрицы и антикодонную шпильку тРНК в Р-участке, была добавлена антикодонная шпилька, которая связывалась с А-участком субъединицы. Для стабилизации сомкнутого состояния с занятым А-участком добавлен аминокгликозидный антибиотик паромомицин (обозначен зеленым цветом).
Ogle et al. (2002) *Cell* 111: 721–732

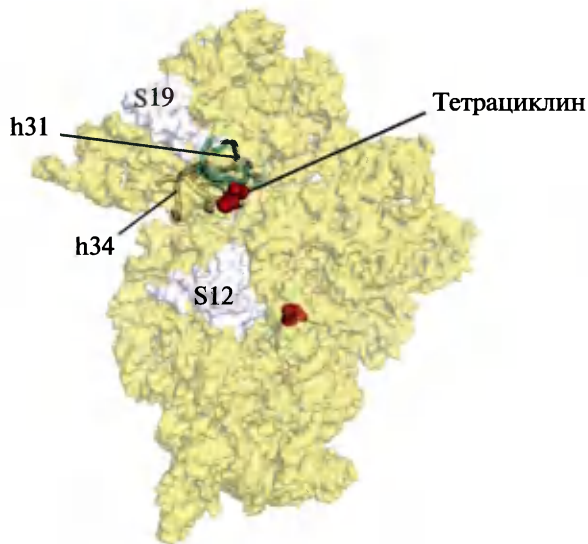


Рис. 9.III. Локализация участка связывания тетрациклина на контактирующей поверхности 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 1HNW. Brodersen et al. (2000) *Cell* **103**: 1143–1154

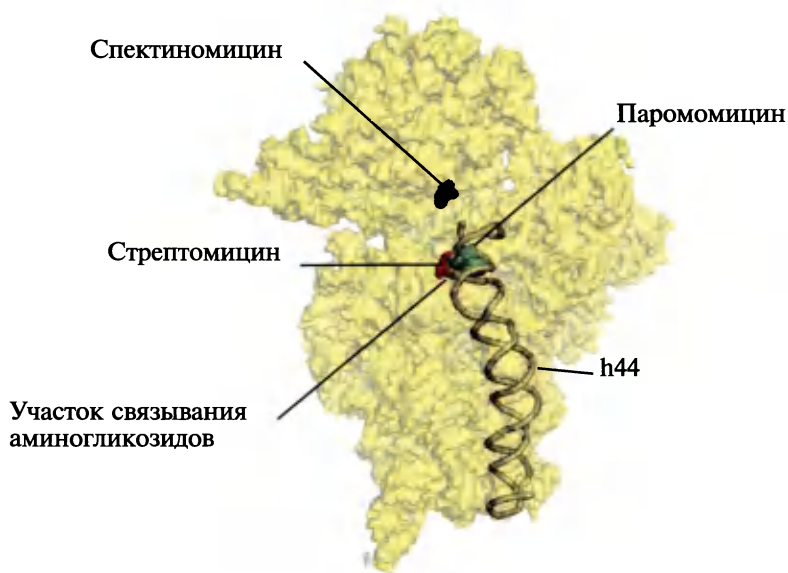


Рис. 9.IV. Локализация участков связывания аминогликозидных антибиотиков и спектиномицина на контактирующей поверхности 30S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 1FJG. Carter et al. (2000) *Nature* **407**: 340–348

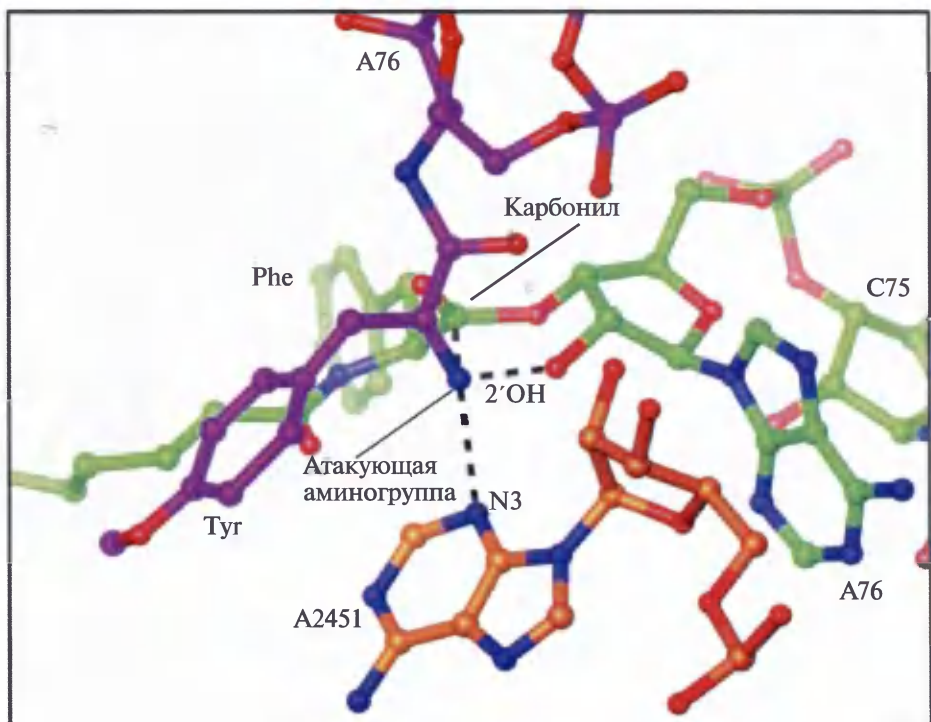


Рис. 10.1. Положения акцепторного и донорного субстратов в *a*- и *p*-участках пептидилтрансферазного центра рибосомы по данным рентгеноструктурного анализа.

Воспроизведено из Hansen et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11670–11675 (Fig.4 A), с разрешения авторов и издательства

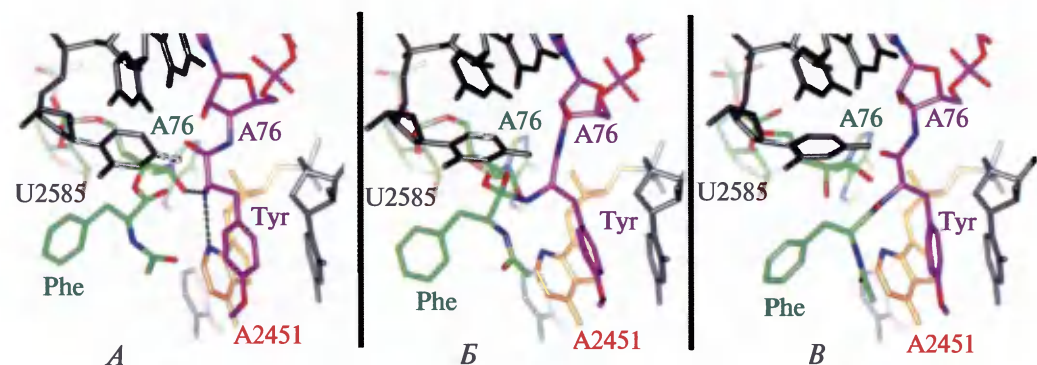


Рис. 10.11. Последовательность событий при образовании пептидной связи в пептидилтрансферазном центре рибосомы.

A: взаимное расположение донорного и акцепторного субстратов; атом азота акцепторного субстрата атакует карбонильный углерод донорного субстрата.

Б: тетраэдрический интермедиат.

В: продукты распада тетраэдрического интермедиата.

Воспроизведено из Hansen et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11670–11675 (Fig.5), с разрешения авторов и издательства

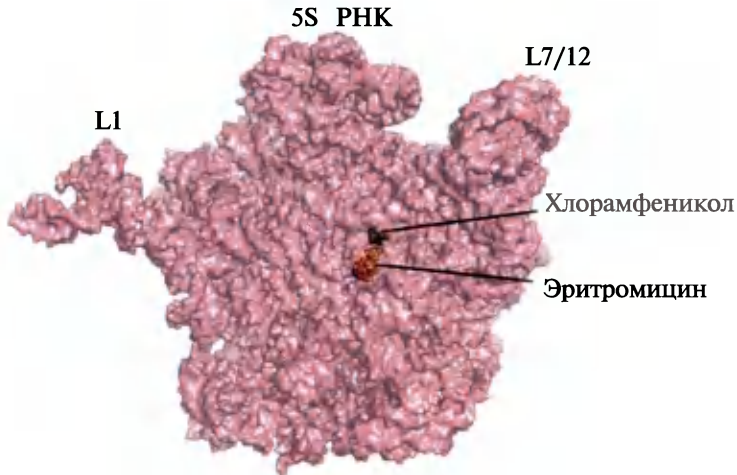


Рис. 10. III. Локализация участков связывания хлорамфеникола и эритромицина в районе ПТЦ на контактирующей поверхности 50S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 1K01 (хлорамфеникол) и 1JZY (эритромицин). Schünzen et al. (2001) *Nature* **413**: 814–821

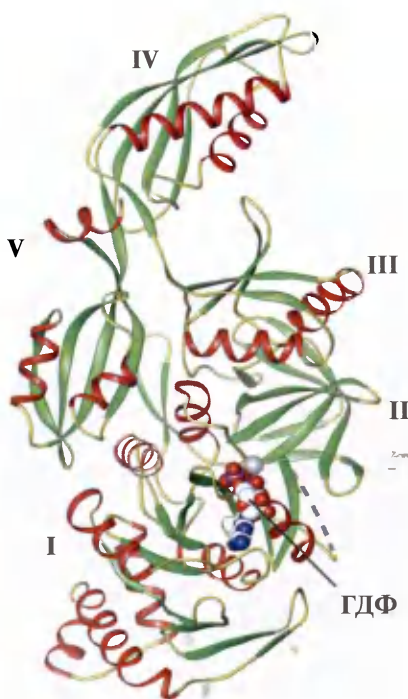


Рис. 11. I. Третичная и вторичная структуры фактора элонгации EF-G из *Thermus thermophilus* по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 1FNM. Laurberg et al. (2000) *J. Mol. Biol.* **303**: 593–603. Ранее структура EF-G из *Thermus thermophilus* была расшифрована одновременно и независимо двумя группами исследователей: американской – Czworkowski et al. (1994) *EMBO J.* **13**: 3661–3668 – и шведско-российской – Aevarsson et al. (1994) *EMBO J.* **13**: 3669–3677, но структура домена III была неполной

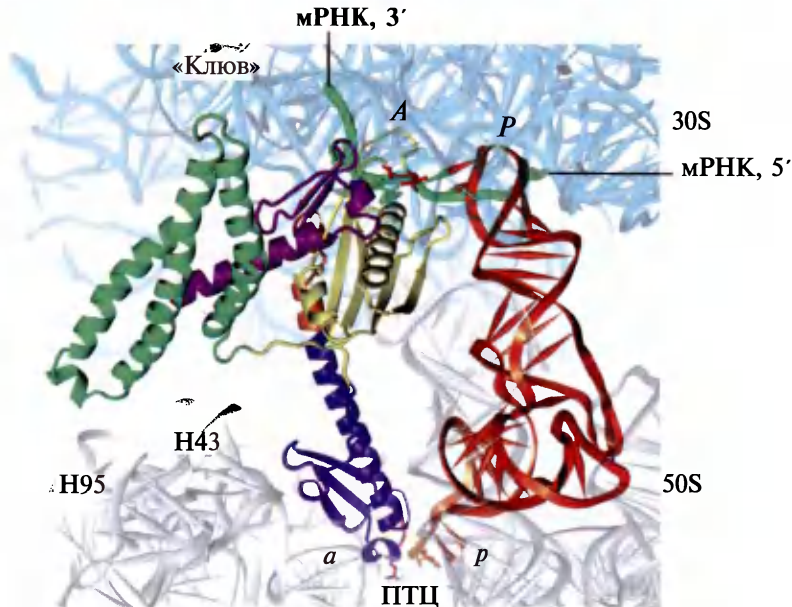


Рис. 13.1. Связывание бактериального фактора терминции RFI с A-участком рибосомы рядом с тРНК, связанной с P-участком, по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 3D5A, 3D5B, 3D5C, 3D5D. Laurberg et al. (2008) *Nature* **454**: 852–857

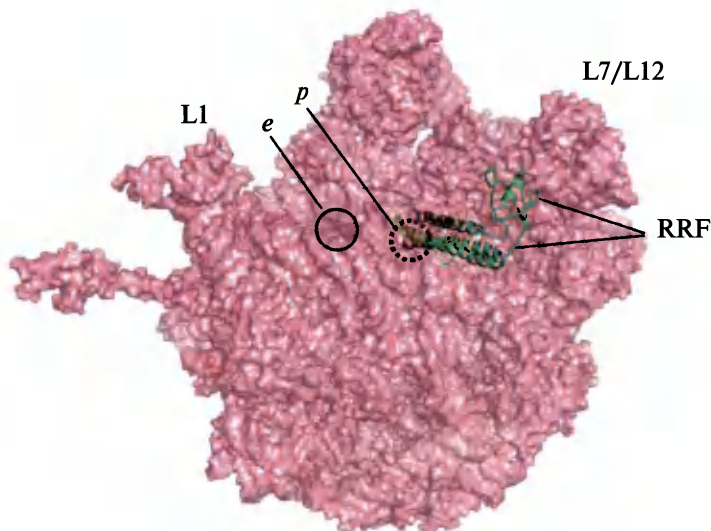


Рис. 13.2. Связывание бактериального фактора терминции RF3 на контактирующей поверхности 50S рибосомной субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа.

PDB ID 2QBE. Borovinskaya et al. (2007) *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**: 727–732

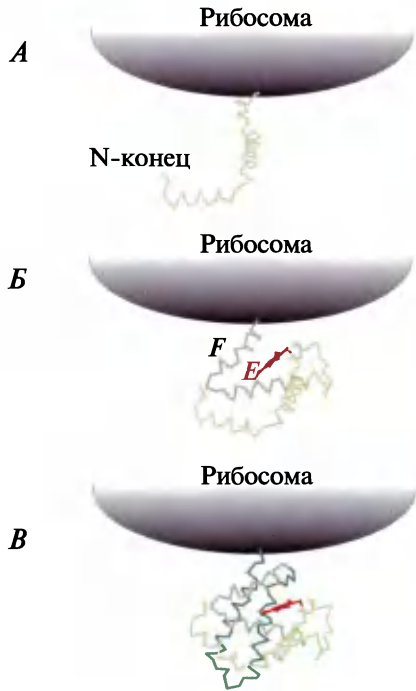


Рис. 17.1. Схематическое изображение котрансляционного сворачивания глобина и котрансляционного связывания гема.

Формирование конформации белка происходит на рибосоме по мере наращивания полипептидной цепи, начиная с N-конца и продолжаясь далее по направлению к C-концу ($A \rightarrow B \rightarrow B$)

Komar et al. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**:10646–10651

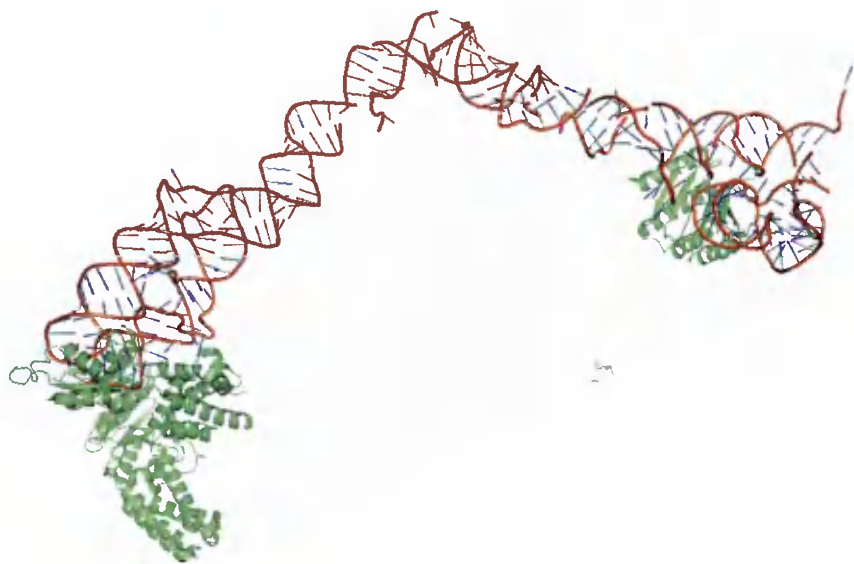
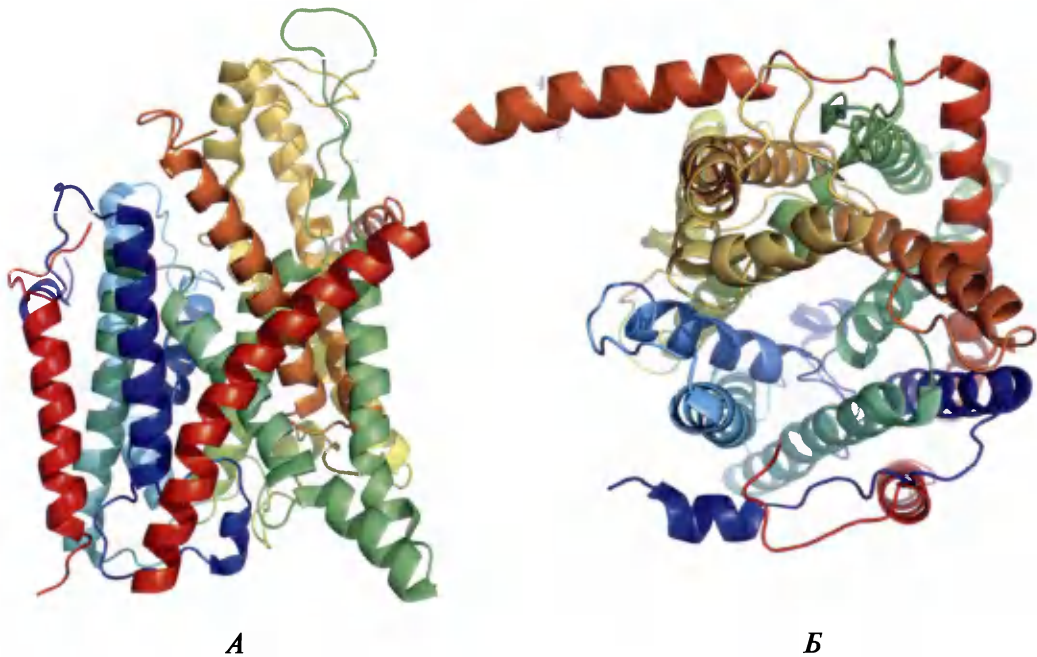


Рис. 17.11. Четвертичная структура сигналузнающей частицы (SRP) млекопитающих, а также вторичные и третичные структуры ее компонентов – 7S РНК и четырех белков – на концах палочкообразной молекулы (SRP19 и SRP54 слева, SRP9 и SRP14 справа) по данным рентгеноструктурного анализа.

Разрывы в полирибонуклеотидной цепи 7S РНК означают, что в использованных типах кристаллов соответствующие участки не разрешаются.

PDB ID 1RY1. Halic et al. (2004) *Nature* **427**: 808–814



A

Б

Рис. 17.III. Структура трансмембранного транслокационного (пептидпроводящего) канала, образуемого гетеротримерным белковым комплексом SecY, по данным рентгеноструктурного анализа комплекса, изолированного из археобактерии *Methanococcus jannaschii*.

A: вид сбоку; цитоплазма сверху, межмембранный просвет внизу.

Б: вид с торца, со стороны цитоплазмы.

Периферические вспомогательные малые субъединицы SecYβ (односпиральная) и SecYγ (двуспиральная) представлены красным цветом. Собственно канал образуется основной субъединицей SecYα, десять спиралей которой окрашены в разные цвета, кроме красного.

PDB ID 1RHZ. Van den Berg et al. (2004) *Nature* **427**: 36–44.

PDB ID 2YXQ. Li et al. (2007) *Mol. Cell* **26**: 511–521