

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ЮСУПОВ Марат Миратович

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ РИБОСОМЫ ЭУКАРИОТ
Результаты рентгено-структурного анализа

03.01.03 – молекулярная биология

02.00.10 – биоорганическая химия

диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва - 2021 г.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ	5
----------	---

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизм синтеза белка	14
1.2. Исследования структуры рибосомы	20
1.2.1. Электронная микроскопия, иммунно-электронная микроскопия и крио-электронная микроскопия	21
1.2.2. Химические сшивки, афинная модификация и аффинные сшивки	25
1.2.3. Нейтронное рассеивание	27
1.2.4. Моделирование рибосомной РНК	28
1.3. Кристаллизация рибосом	29
1.4. Кристаллическая структура бактериальной рибосомы	32
1.5. Функциональные центры рибосомы	35
1.5.1. Декодирование	35
1.5.2. Пептидил-трансфераза	37
1.5.3. Транслокация тРНК и матрицы	39
1.6. Антибиотики	41
1.7. Заключение	46

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы и биопрепараты	48
2.2. Буферы и растворы	49
2.3. Выделение рибосом из дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.4. Электрофорез белков в SDS-ПААГ	53
2.5. Выделение рРНК для электрофореза	54

2.6 Электрофорез рРНК в денатурирующем ПААГ	54
2.7. Кристаллизация рибосом <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
2.8. Обработка кристаллов и заморозка	55
2.9. Сбор кристаллографических данных	55
2.10. Расчет карт, построение моделей и их уточнение	56
2.11. Вымачивание кристаллов рибосом <i>Saccharomyces cerevisiae</i> с ингибиторами	57
2.12. Ко-кристаллизация рибосом <i>Saccharomyces cerevisiae</i> с ингибиторами	57

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Кристаллизация рибосом <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.1.1. Выделение рибосом для кристаллизации	59
3.1.2. Выращивание кристаллов рибосом	61
3.1.3. Дегидратация кристаллов и их замораживание	62
3.2. Решение структуры рибосомы <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
3.3. Интерпретация электронной плотности	66
3.4. Модель рибосомы эукариот	68
3.4.1. Консервативное «ядро» рибосомы	68
3.4.2. Дополнительные сегменты рибосомных РНК	71
3.4.3. Дополнительные рибосомные белки	72
3.4.4. Анализ структуры рибосом эукариот	73
3.4.5. Консервативность функциональных участков	77
3.4.6. Межсубчастичные мосты рибосомы <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
3.4.7. Нерибосомный белок Stm1	81
3.4.8. Новая номенклатура рибосомных белков	82

3.5. Выводы из анализа структуры рибосом прокариот и эукариот	84
3.6. Структурные исследования ингибиторов рибосомы эукариот	87
3.6.1. Центры связывания рибосомных ингибиторов	88
3.6.1.1. Е-тРНК связывающий участок	94
3.6.1.2. Пептидил-трансферазный Центр	97
3.6.1.3. Декодирующий центр	101
3.6.1.4. Участки связывания мРНК и тРНК	104
3.7. Рибосомные ингибиторы как потенциальные лекарства против раковых заболеваний	107
3.7.1. Е-тРНК связывающий участок	107
3.7.2. Пептидил-трансферазный Центр	110
3.7.3. Участок связывания мРНК и тРНК	115
3.8. Аминогликозиды как потенциальные лекарства против генетических заболеваний, вызванных появлением преждевременных «стоп» кодонов в смысловых генах	117
3.9. Заключение	123
ВЫВОДЫ	124
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	125
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	132

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A-участок участок связывания тРНК на рибосоме

DTT 1,4-дитио-DL-треитол

E- участок участок связывания тРНК на рибосоме

GTP гуанозинтрифосфат

HEPES -- N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота

L белки большой субчастицы

P- участок участок связывания тРНК на рибосоме

RRF фактор рециклизации рибосом

S белки малой субчастицы

YPAD среда для выращивания дрожжей

aa-тРНК аминоксил-тРНК

Да, кДа -- дальтон, килодальтон ДМСО -- диметилсульфоксид

ДНК -- дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ -- дитиотреитол

eEF1A, EF-Tu и EF-G факторы элонгации

eRF1 и eRF3 факторы терминации

Крио ЭМ криоэлектронная микроскопия

ПТЦ пептидилтрансферазный центр

ПААГ -- полиакриламидный гель

ПЭГ полиэтиленгликоль

p-белки рибосомные белки

РНК – рибонуклеиновая кислота мРНК – матричная РНК

РНП -- рибонуклеопротеин

pРНК рибосомная РНК

РСА рентгеноструктурный анализ

ЭДТА -- этилендиаминтетраацетат натрия

Tris – трис (гидроксиметил) аминометан

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Экспрессия генов в клетках живых организмов - это перевод генетической информации, записанной четырех-буквенным кодом нуклеотидов в молекуле ДНК (хромосома), в структуру белка, состоящего из двадцати аминокислот, и который осуществляется макромолекулярной машиной рибосомой. Энзиматические реакции рибосомы исследовались несколько десятилетий и к моменту начала нашего структурного исследования уже было составлено схематическое представление о практически всех процессах работы рибосомы и участия основных лигандов белкового синтеза. Были описаны свойства матричных РНК (мРНК), транспортных РНК (тРНК) и белковых факторов трансляции, обеспечивающих синтез белка в клетке (1, 2). На начальных этапах, исследования структуры рибосомы были сфокусированы на отдельных компонентах составляющих бактериальную рибосому из клеток *Escherichia coli*, представляющих наиболее удобную модель для лабораторных исследований. В результате было показано, что бактериальная рибосома состоит из двух неравных несимметричных субчастиц. Большая субчастица 50S содержит две цепи рибосомной РНК (рРНК) (23S рРНК, 2904 нуклеотида, и 5S рРНК, 120 нуклеотидов) и 32 индивидуальных рибосомных белка. Малая субчастица 30S содержит одну рибосомную РНК (16S рРНК, 1542 нуклеотида) и 21 индивидуальных рибосомных белка. Нуклеотидные последовательности рибосомных РНК были определены и вторичные структуры были предсказаны (3). Первичные структуры рибосомных белков были также определены (4). Методом рентгено-структурного анализа были исследованы структуры ряда индивидуальных рибосомных белков (5, 6). На основании результатов

электронной микроскопии впервые было предложено описание формы рибосомы (7-12). Было также показано, что рибосомная РНК формирует основу структуры обеих субчастиц и определяет ее форму. Оказалось, что часть рибосомных белков, названных «основными», помогают формировать основу, так называемую «сердцевину» рибосомы, а другая часть рибосомных белков, названных «вспомогательными», расположены ближе к поверхности рибосомы (13). С помощью метода бомбардировки газообразным тритием было обнаружено полное отсутствие рибосомальных белков на поверхности контакта двух рибосомных субчастиц. Этим же методом было показано, что на поверхности рибосомы индивидуальные рибосомные белки экспонированы в разной степени (14).

Первые кристаллы 50S рибосомных субчастиц пригодных для использования рентгено-структурного анализа были получены в группе Ады Йонат в Западном Берлине в 1982 (15). Первые кристаллы 30S рибосомных субчастиц и полной 70S рибосомы были получены нами в совместном проекте Института белка АН СССР и Института Кристаллографии АН СССР в 1983 (16, 17). Эта методология кристаллизации рибосом и рибосомных субчастиц была позже оптимизирована и использована для решения структуры этих макромолекул методом рентгено-структурного анализа.

Первая кристаллическая структура полной 70S рибосомы *Thermus thermophilus* была решена нами в совместном проекте с Гарри Ноллером (Калифорнийский Университет, США) при среднем разрешении в 2000 году (18, 19). Кристаллические структуры рибосомных субчастиц были решены с использованием 30S субчастиц *T. thermophilus* (20, 21) и 50S субчастиц *Haloarcula marismortui* (22, 23). Полученные модели индивидуальных рибосомных субчастиц и экспериментальные карты электронной плотности

полной 70S рибосомы, содержащие три молекулы тРНК и мРНК, были использованы нашей группой для моделирования полной рибосомы *T. Thermophilus* (18, 19, 24).

Степень разработанности темы

Ранее были обнаружены двумерные кристаллы эукариотических рибосом в клетках эмбриона курицы. Были разработаны подходы для кристаллизации рибосомных частиц термофильных бактерий. Была решена кристаллическая структура бактериальной рибосомы. Знания о структуре эукариотической рибосомы в основном базировались на знаниях структуры бактериальной рибосомы.

Цели и задачи исследования

Кристаллизация и определение атомарной структуры рибосомы эукариот являются логическим продолжением исследования бактериальной рибосомы. С одной стороны знания структуры рибосомы эукариот открывают возможность исследования сложных механизмов регуляции трансляции высших организмов, а с другой стороны сравнение структуры с рибосомой прокариот позволяет объяснить правила распознавания антибиотиками рибосом бактерий и человека.

Были поставлены следующие задачи:

1. Определить кристаллическую структуру полной рибосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* .
2. Сравнить сруктуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* с рибосомами бастерий и человека.

3. Определить структуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* в комплексе с ингибиторами трансляции эукариот.

4. Определить структуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* в комплексе с ингибиторами - потенциальными лекарствами против раковых заболеваний.

5. Определить структуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* в комплексе с ингибиторами - потенциальными лекарствами против генетических заболеваний, вызванных появлением преждевременных «стоп» кодонов в смысловых генах.

Объект исследования – кристаллография эукариотической рибосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Предмет исследования – структура рибосомы эукариот

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые определена кристаллическая структура рибосомы низших эукариот дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Впервые проведены сравнения структур рибосом бактерий и низших эукариот. Показана высокая гомология и консервативность основных функциональных центров рибосом в участках связывания мРНК и тРНК у бактерий, низших и высших эукариот, включая человека. Выявлены правила дескриминации рибосом прокариот и эукариот для ряда ингибиторов трансляции.

Показана возможность использования кристаллографии *Saccharomyces cerevisiae* рибосом в разработке лекарственных препаратов для человека.

Методология диссертационного исследования

При разработке методов выделения, очистки и кристаллизации рибосом *Saccharomyces cerevisiae* использовали современные биохимические и биофизические методы для анализа структурного качества препаратов. Решение структуры рибосом *Saccharomyces cerevisiae* и ее комплексов было выполнено методом рентгено-структурного анализа с применением современных синхротронов в Швейцарии и Франции, оптимизированных для работы с макромолекулярными комплексами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Кристаллическая структура эукариотической рибосомы *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Консервативность функциональных центров рибосомы прокариот и эукариот.
3. Структура центров связывания 16 эукариот-специфических ингибиторов рибосомы.
4. Правила специфичности для ингибиторов декодирующего центра и пептидил-трансферазного центра эукариотической рибосомы.
5. Центры связывания и механизмы функционирования на рибосоме 4 новых веществ, потенциальных антираковых препаратов.
6. Центры связывания на рибосоме 4 аминогликозидов, потенциальных лекарств при генетических заболеваниях, связанных с появлением преждевременных «стоп» мутаций в смысловых последовательностях генов.

Степень достоверности результатов

Основной метод в представленной серии работ – метод рентгено-структурного анализа, который дает наиболее достоверную информацию о структуре макромолекул, полученных в кристаллической форме. Полученные электронные плотности с разрешением 3.5 – 2.8 Å интерпретированы на атомарном уровне достоверности.

Апробация работы

Результаты работы были представлены в виде устных докладов на 76 международных конференциях, включая основные доклады конференций: Структура и функция рибосомы, Франция, 2016 (The EMBO Keynote Lecture), Конференция кристаллографического общества Австрии, 2014 (The EMBO Keynote Lecture), Структура и функция tRNA, Греция, 2014 (The EMBO Keynote Lecture), Европейский кристаллографический конгресс, Англия 2013, (The EMBO Keynote Lecture), Биогенез рибосомы, Канада, 2012 (The EMBO Keynote Lecture).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 46 публикациях, представленных в международных системах цитирования Web of Science и Scopus, а также в библиографической базе PubMed.

Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором лично. Исследования затрагивали многие аспекты молекулярной биологии и выполнены в соавторстве с большим коллективом. Первая часть работы по кристаллизации

рибосомы бактерий и предварительный рентгено-структурный анализ был выполнен в Институте белка АН СССР в сотрудничестве с Институтом кристаллографии АН СССР и Институтом Молекулярной и клеточной биологии в Страсбурге, Франция. Вторая часть работы по решению структуры бактериальной рибосомы была выполнена в Калифорнийском университете, США. Третья часть работы по решению структуры рибосомы дрожжей была выполнена в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии в Страсбурге, Франция. Автору принадлежит основная роль в выборе направления исследований, формулировке целей и задач исследований, проведении экспериментов, разработке методик, анализу полученных результатов, обобщении и представлении результатов в виде статей и докладов на конференциях.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы» (раздел содержит 197 ссылок). Работу иллюстрируют 56 рисунков и 2 таблицы. Общий объем диссертации 151 страница.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизм синтеза белка

Рибосома представляет собой рибонуклеопротеиновую частицу, которая синтезирует белки во всех клетках с использованием матричной РНК (мРНК) и аминокислотированных транспортных РНК (тРНК) в качестве субстратов. Рибосомы бактерий состоят из большой (50S) и малой (30S) субчастиц, которые вместе составляют 2,5-мега Дальтонную рибосому 70S и их эукариотическими аналогами являются субчастицы 60S и 40S и 80S рибосома. Молекулярный вес рибосомы высших организмов достигает 3,5 – 4,5-мега Дальтон. Кроме того, с рибосомой связываются несколько белковых факторов на различных этапах трансляции (обзор (25)). Схематическое изображение бактериальной рибосомы с основными функциональными центрами показано на Рис. 1.

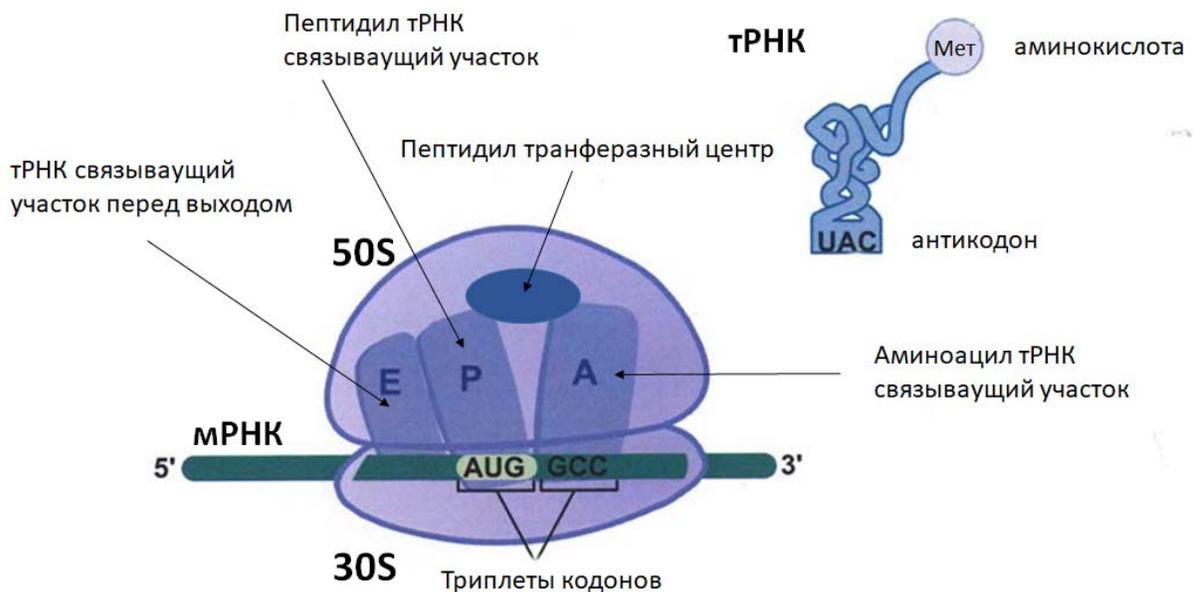


Рис. 1. Схематическое изображение рибосомы и тРНК. Показаны три участка связывания тРНК между двумя субчастицами. Матричная РНК связывается с 30S субчастицей и стартовый кодон находится в Р участке. Пептидил-трансферазный центр находится на 50S субчастице.

Поверхность между двумя субчастицами состоит в основном из рибосомной РНК. Матричная РНК связывается в расщелине между головкой и телом 30S субчастицы, где ее кодоны взаимодействуют с антикодонами тРНК. Существует три тРНК-связывающих участка: участок «А», который связывает входящую аминоацил-тРНК (aminoacyl-tRNA), участок «Р», который содержит тРНК с присоединенной к ней растущей полипептидной цепи (peptidyl-tRNA), и участок «Е» (exit-выход) в который перемещается деацилированная тРНК из Р-участка после образования пептидной связи до ее выхода из рибосомы. На 50S субчастице 3'-концы тРНК в Р и А участках находятся в непосредственной близости от пептидил-трансферазного центра рибосомы (РТЦ).

Процесс трансляции делится на четыре основных этапа: ИНИЦИАЦИЯ, ЭЛОНГАЦИЯ, ТЕРМИНАЦИЯ И РЕЦИРКУЛЯЦИЯ (подготовка рибосомы к повторному использованию). Механизм трансляции у прокариот и эукариот представлен на рисунке 2. Полимеризация полипептидной цепи происходит во время элонгации, когда рибосома прочитывает мРНК, выбирая специфическую аминоацил-тРНК (aa-тРНК) на каждой триплет кодона. L-образные молекулы тРНК ориентированы на рибосоме таким образом, что кодон-антикодоновая спираль находится на 30S субчастице, тогда как 3'-ССА концы тРНК находятся на 50S субъединице.

Прокариоты

Эукариоты

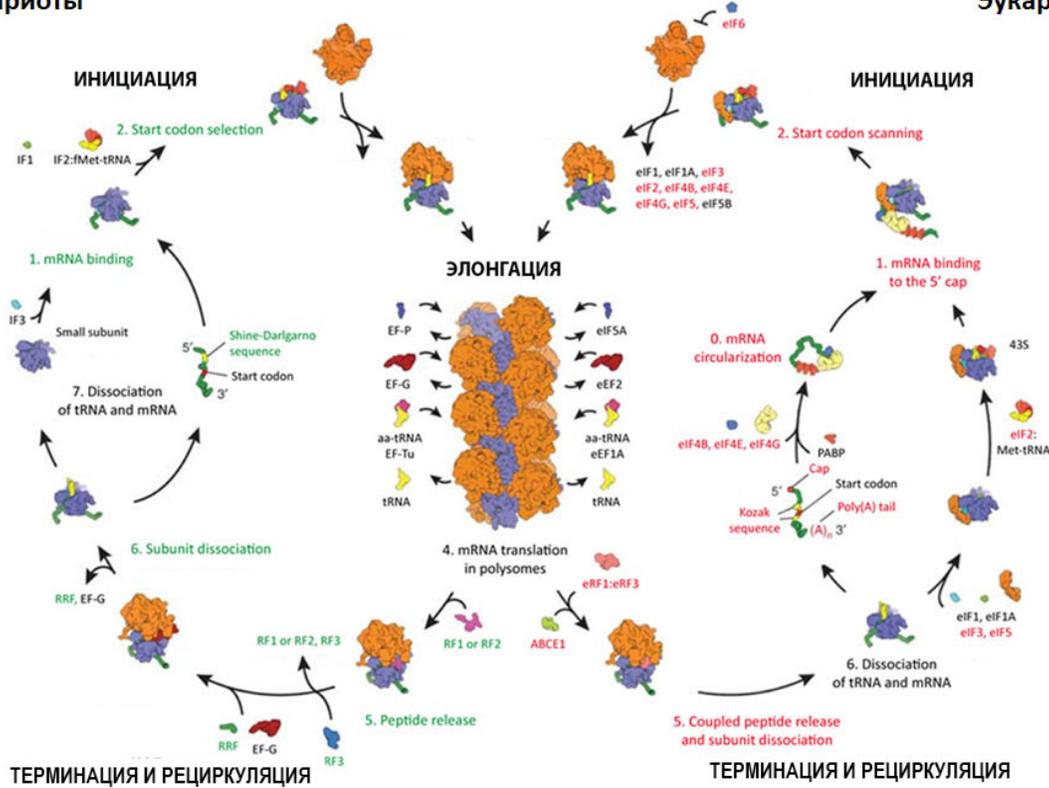


Рис. 2. Цикл трансляции у бактерий и эукариот. Трансляция - это четырехступенчатый процесс, который включает в себя этапы инициации, элонгации, терминации и рециркуляции рибосом. Каждый из этих этапов сопровождается участием белковых факторов, называемыми факторами инициации (IFs у бактерий или eIFs у эукариот), факторами элонгации (EFs или eEFs), факторами терминации (RFs или eRFs) и факторами рециркуляции. Стадия элонгации является наиболее консервативным этапом, схожим у бактерий и эукариот, и поддерживается гомологичными факторами элонгации (все гомологичные факторы и общие этапы трансляции обозначены черным цветом на рисунке). На этом этапе рибосомы собираются в большие спиральные комплексы, называемые полисомами, где внутренняя оболочка

занята малой рибосомной субъединицей и мРНК, а внешняя оболочка образована большой рибосомной субъединицей, из которой при трансляции возникает зарождающийся пептид (26-28). Другие стадии цикла трансляции различаются и включают в себя несколько стадий (обозначенных цифрами), которые различаются между бактериями (зелеными) и эукариотами (красными). Факторы инициации, терминации и утилизации, катализирующие эти стадии, включают множество негомологичных белков, специфичных либо для бактерий (зеленый цвет), либо для эукариот (красный цвет).

Процесс инициации трансляции заключается в связывании уникальной инициаторной fMet-tRNA^{fMet} в Р-участок рибосомы, где она взаимодействует с стартовым кодоном последовательности гена мРНК.

Элонгация состоит из последовательного добавления аминокислот в полипептидную цепь (Рис.2). Этот процесс сопровождается циклическим передвижением тРНК через три участка связывания тРНК (А / Р / Е) рибосомы. Число элонгационных циклов определяется длиной синтезирующейся полипептидной цепи. В начале цикла, рибосома содержит пептидил-тРНК с N-концевой полипептидной цепью в Р-участке или инициаторную fMet-tRNA^{fMet} и свободный А-участок. В процессе декодирования следующая аминокислота поставляется в рибосому комплексом содержащем элонгационный фактор Tu (EF-Tu), ГТФ и аминоацил-тРНК. Этот процесс называется ДЕКОДИРОВАНИЕ. После расщепления ГТФ элонгационный фактор Tu диссоциирует с рибосомы и ССА конец аминоацил-тРНК перемещается в пептидил-трансферазный центр рибосомы. Далее следует реакция ТРАНСПЕПТИДАЦИИ - образование пептидной связи, что приводит к удлинению полипептидной цепи на одну аминокислоту. Таким образом

растущий пептид оказывается на тРНК в А участке, а тРНК в Р участке остается деацелированной. Это состояние рибосомы называется пре-транслокационным комплексом и характеризуется как динамичное состояние рибосомы. В этом комплексе тРНК в А и Р участках колеблется между классическим положением А/А и Р/Р и так называемым гибридным положением А/Р и Р/Е в котором 3'-ССА концы обеих тРНК перемещаются относительно большой субъединицы, не меняя положения относительно малой субъединицы (Рис. 3). Цикл элонгации продолжается ТРАНСЛОКАЦИЕЙ А- и Р-тРНК относительно малой субъединицы. Этот сложный и многоступенчатый процесс катализируется фактором элонгации G (EF-G) продвигая комплекс мРНК-тРНК в Р и Е участки. При этом формируется пост-транслокационный комплекс и следующий кодон мРНК входит А участок (Рис. 3). В процессе элонгации нарождающаяся полипептидная цепь проходит до конца пептидного туннеля большой рибосомной субчастицы и оказывается в цитоплазме, где происходит сворачивание белка.

Остановка синтеза белка происходит, когда стоп кодон мРНК входит в А участок рибосомы. Белковые факторы терминации RF1 и RF2 специфически узнают стоп кодон и гидролизуют связь пептида и тРНК в Р участке. Терминация завершается при участии белкового фактора RF3. Диссоциация рибосомных субъединиц, деацелированной тРНК и мРНК происходит через многошаговый процесс также с участием белковых факторов RRF и EFG, который называется РЕЦИРКУЛЯЦИЯ или подготовка рибосомы к повторному использованию.

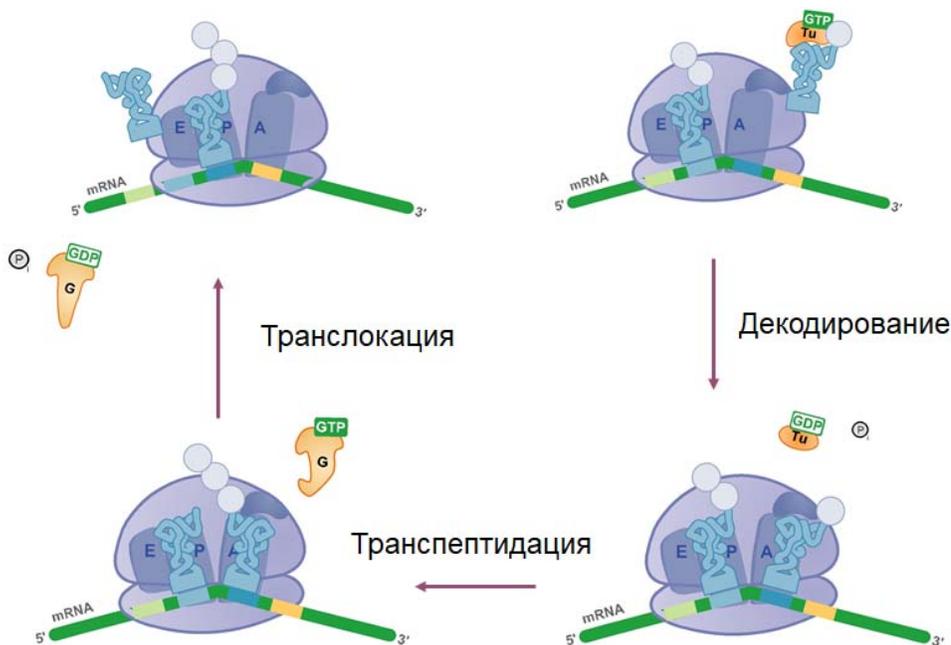


Рис.3. Механизм биосинтеза белка. Элонгация. ДЕКОДИРОВАНИЕ. В процессе декодирования следующая аминокислота поставляется в рибосому комплексом содержащем элонгационный фактор Tu (EF-Tu), ГТФ и аминоацил-тРНК. ТРАНСПЕПТИДАЦИЯ. Это образование пептидной связи. ТРАНСЛОКАЦИЯ. Передвижение комплекса mRNA-tRNA в P и E участки. Катализируется фактором элонгации G (EF-G).

1.2. Исследования структуры рибосомы

Наше понимание трехмерной организации структуры рибосомы в 90-е годы сводились в основном к фрагментарной информации полученной с помощью метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и метода рентгено-структурного анализа малых субдоменов рибосомной РНК и 10 индивидуальных рибосомных белков (5, 29-32). Взаимосвязи между структурой и функциями рибосомы продолжали определяться на основе моделей, полученных с помощью электронной микроскопии (ЭМ),

нейтронной дифракции и молекулярного моделирования на основе результатов биофизических и биохимических исследований (33-35).

Таким образом, основная стратегия решения структуры полной рибосомы сводилась к получению информации высокого разрешения фрагментов рибосомы. При таком подходе планировалось решать небольшие поддомены рибосомы, которые поддаются стандартным методам исследования структуры высокого разрешения, как методы кристаллографии и ЯМР (29, 30). Такие домены планировалось использовать для интерпретации EM моделей полной рибосомы полученных на низком-разрешении.

На конец 1990-х годов был достигнут значительный успех в решении структур отдельных рибосомных белков. Это белки S5 (43), S6 (44), S8 (45), S17 малой субчастицы и L1 (47), L7 (48), L9 (49), L14 (50), и L30 большой субчастицы (5). Все эти структуры были решены методом рентгено-структурного анализа, за исключением белка S17, структура которого была установлена методом ЯМР спектроскопии (36). Методом ЯМР также был использован для исследования подвижности белков в комплексе L7/L12-L10 (32, 37).

Наряду с вышеуказанными отдельными рибосомными белковыми структурами, с помощью ЯМР изучались также структуры небольших фрагментов рибосомных РНК (29). Этот метод ЯМР на тот период мог быть использован для решения структур фрагментов РНК длиной до 75 нуклеотидов. Так были решены структуры спирали I и "петли E" 5S рРНК, альфа-сарциновой петли 23S рРНК, тиостриптон-связывающего участка 23S рРНК и участка декодирования 16S рРНК (29, 38-40).

Позднее были получены кристаллы и решены структуры доменов рибосомы, содержащие фрагменты рРНК и рибосомные белки (30, 31).

1.2.1. Электронная микроскопия, иммунно-электронная микроскопия и крио-электронная микроскопия

Рибосомы впервые были обнаружены методом ЭМ более 60 лет назад и наше понимание трехмерной структуры рибосом продолжало основываться на возможностях этого метода. Лаборатории Виктора Васильева и Джеймса Лейка впервые предложили модели несимметричной структуры 30S субчастицы («V-образная» модель) и 50S субчастицы («корона-образная» модель) бактериальной рибосомы (Рис. 4) (8, 9, 41).

Параллельно с развитием методов электронной микроскопии и улучшением изображений рибосом был предложен новый подход для локализации белков на поверхности рибосомных субчастиц – метод иммунно-электронной микроскопии (42, 43). Этот метод основан на получении антител к индивидуальным рибосомным белкам с последующей обработкой ими препарата рибосом для ЭМ анализа. В полученных ЭМ изображениях анализировались димеры рибосом, образовавшиеся между антителом и двумя рибосомами.

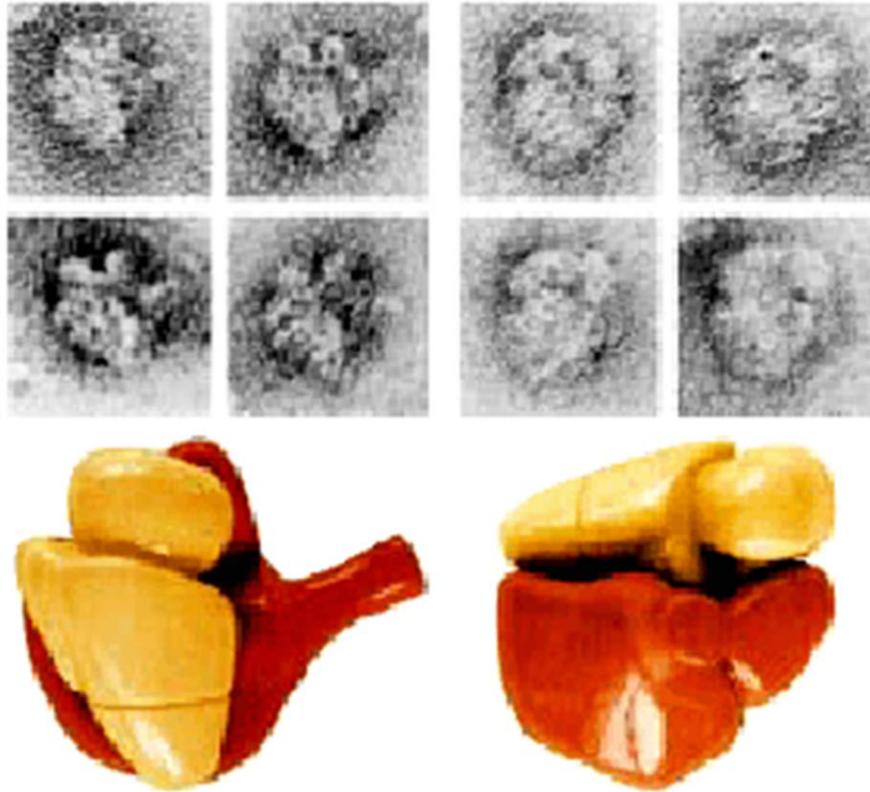


Рис. 4. Модель бактериальной рибосомы, предложенная В. Васильевым на основании ЭМ изображений, полученных методом негативного контрастирования уранилацетатом (41).

Такой подход позволил обнаружить антигенные детерминанты ряда рибосомных белков на поверхности рибосомы. К сожалению, позже оказалось, что препараты рибосомных белков, которые использовались для получения антител, были не достаточно очищены от примесей других рибосомных белков. Поэтому некоторые рибосомные белки имели несколько антигенных детерминант на поверхности рибосомы, что привело к неправильной интерпретации локализации белков на рибосоме.

С другой стороны аккуратное использование этого метода позволило определить 3' и 5'-концы 5S РНК, 16S РНК и 23S РНК на рибосомных

субчастицах (44-47). Более того, этим подходом был исследован мРНК фрагмент на рибосоме, что возволило авторам предложить модель прохода матричной РНК вокруг головного домена малой рибосомной субчастицы (Рис. 5) (45).

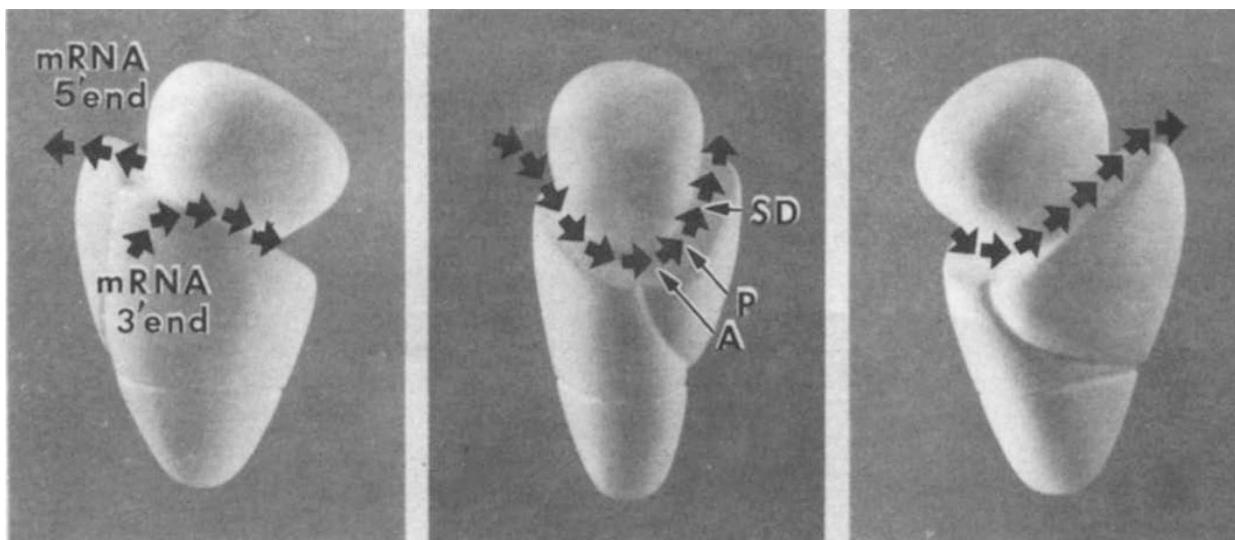


Рис. 5. Модель прохода матричной РНК вокруг «головного» домена малой рибосомной субчастицы, предложена по результатам иммуно-электронной микроскопии (48).

Был достигнут значительный прогресс в исследовании структуры рибосом и рибосомных комплексов низкого разрешения, используя трехмерную реконструкцию ЭМ изображений рибосом, замороженных в тонком слое жидкости (крио-ЕМ) (12, 49). Случайно ориентированные изображения вычислительно идентифицируются, сортируются и классифицируются по различной ориентации частицы. Эти данные используются для реконструкции трехмерной модели рибосомы. К концу

1990-х две исследовательские группы независимо использовали этот подход крио-ЕМ для получения структуры бактериальной рибосомы *E. coli*.

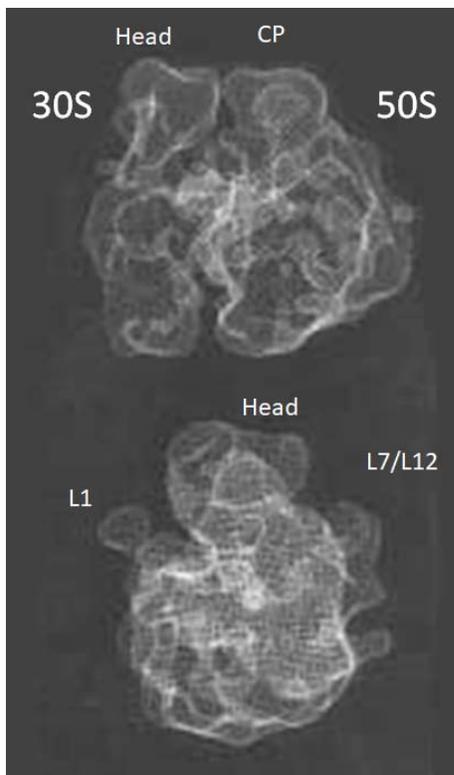


Рис. 6. Структура 70S рибосомы *E. coli* с разрешением 25Å полученная методом крио-электронной микроскопии (11).

Реконструированная модель рибосомы из лаборатории Франка и его коллег с разрешением 25Å показана на рисунке 6. Паралельная работа была сделана в лаборатории ван Хила (12). Частица 70S имеет общий диаметр около 220 Å. Все классические особенности, в том числе «голова», «шея», «щели», и «платформа» малой субъединицы, и три выступа в верхней части большой субъединицы узнаваемы по более ранним исследования ЭМ, которые были выполнены в лабораториях Васильева и Лейка (9, 13). В целом, были описаны размеры и формы субъединиц, общая геометрия их ассоциации друг с другом,

как и предсказывалось в более ранних исследований. При этом разрешении (25Å) некоторые спирали РНК оказались различимы, хотя и не однозначно, и в целом нельзя было четко отличить белки от РНК.

Дальнейшее развитие метода и исследование более сложных комплексов рибосомы позволило увидеть впервые расположение тРНК на внутренней поверхности рибосомных субчастиц (Рис.7). В этих работах было впервые показано напрямую наличие E участка связывания тРНК (33).

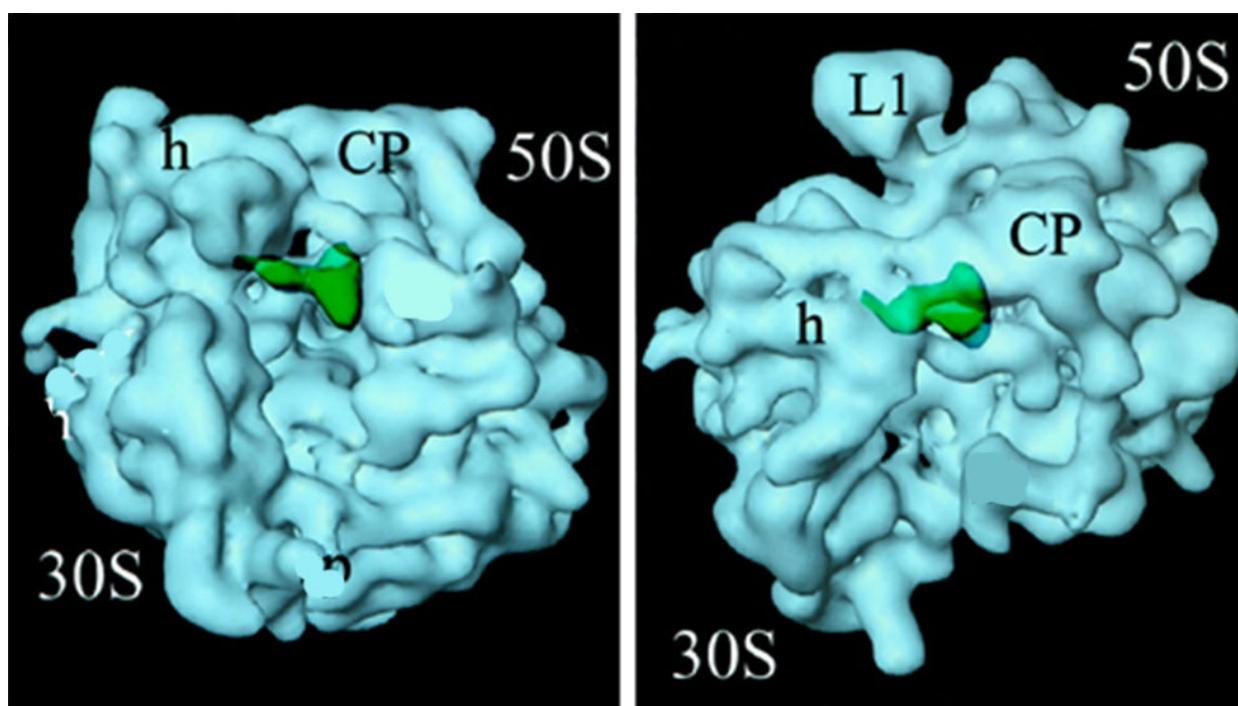


Рис.7. Комплекс рибосомы содержащей fMet-тРНК в Р участке, показано зеленым цветом (33, 50). «h» - «голова» малой субчастицы, CP – центральный выступ большой субчастицы.

1.2.2. Химические сшивки, афинная модификация и аффинные сшивки

Взаиморасположение рибосомных белков, выявление соседних белков, идентификация последовательностей рРНК взаимодействующих с белками,

идентификация участков рРНК и белков участвующих в организации функциональных центров рибосомы – эти задачи решались с помощью методов белок-белковых или РНК-белковых сшивок, афинных сшивок и афинных модификаций (51-53). К сожалению такие подходы для изучения структуры рибосомы не могли давать однозначную информацию, так как основаны на анализе малой доли рибосом (иногда менее 1%) анализируемого образца, который не может быть полностью структурно гомогенным. Однако, основываясь на результатах таких экспериментов было предложено несколько моделей рибосомных субчастиц, которые оказались важными стимуляторами научной активности и проверок предложенных моделей. Например, модель 30S субчастицы, предложенная А.Спириным, В.Васильевым и И.Сердюком, основывалась на результатах ЕМ рибосомных субчастиц и опубликованных результатах исследований иммуно-электронной микроскопии после перепроверки чистоты антител к рибосомным белкам и результатах белок-белковых сшивок. Предложенная модель проверялась экспериментально методом нейтронного рассеивания и рентгеновского рассеивания в растворе (Рис. 8) (54). Другой подход молекулярного моделирования малой рибосомной субчастицы был основан на филогенетически предсказанной вторичной структуре 16S РНК (55, 56).

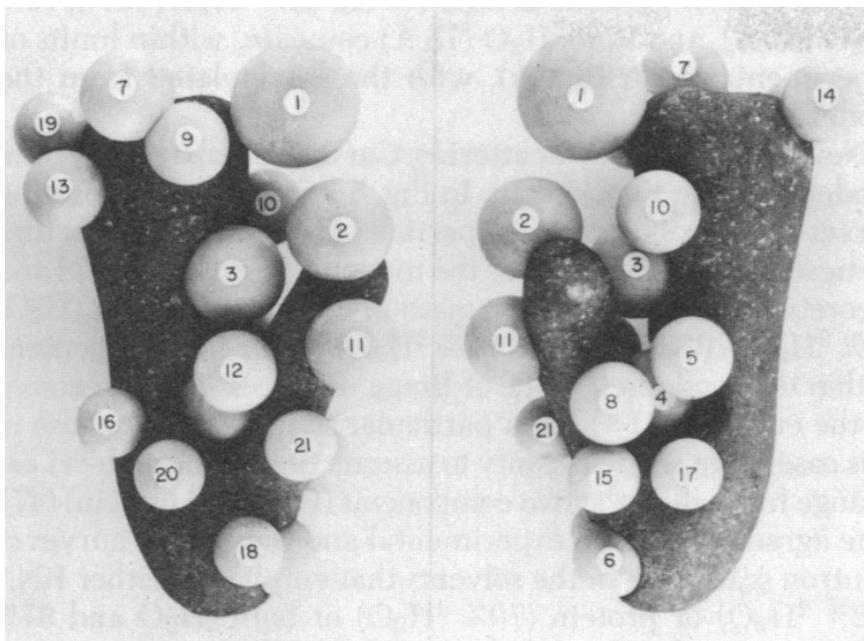


Рис. 8. Модель 30S субчастицы, предложенная А.Спириным, В.Васильевым и И.Сердюком, Институт белка АН СССР.

1.2.3. Нейтронное рассеивание

Одним из важнейших достижений в области исследования структуры рибосом являлась опубликованная карта положения центров масс 21 рибосомного белка малой субъединицы, решенная методом нейтронного рассеивания (57). Этот подход позволяет измерить расстояния между центрами масс двух белков на рибосоме. Модель рибосомы, созданная на основании этих результатов, также была хорошим стимулятором для проверок и дискуссий в рибосомном сообществе (Рис. 9).

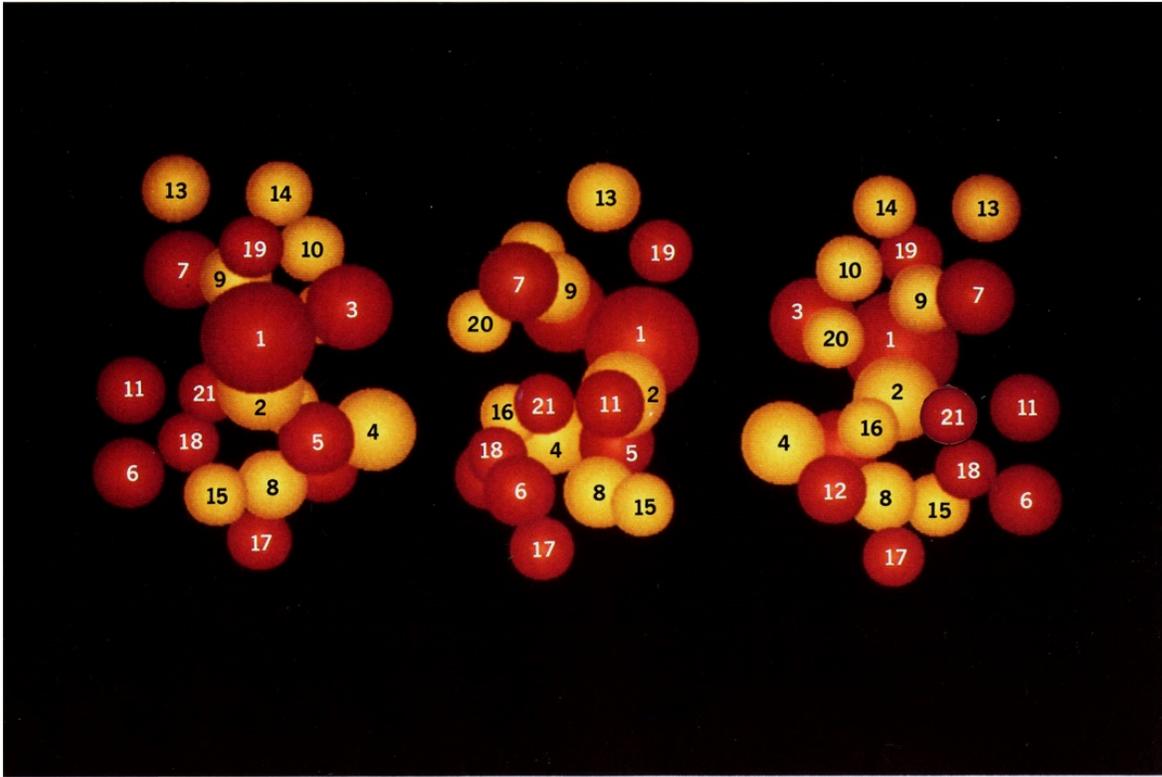


Рис. 9. Карта положения центров масс 21 рибосомного белка малой субъединицы, решенная методом нейтронного рассеивания (57, 58).

1.2.4. Моделирование рибосомной РНК

Поэтапная экстракция белков с рибосомных субчастиц обработкой повышающейся концентрацией LiCl и ЭМ анализ получаемых РНП частиц показал, что рибосомная РНК формирует основу формы рибосомы (Рис. 10) (59, 60). С одной стороны, эти результаты использовались при моделировании малой рибосомной субчастицы (Рис. 8), а с другой стороны, оказалось возможным моделировать третичную структуру субчастиц основываясь на предсказанной вторичной структуре рибосомных РНК (3).

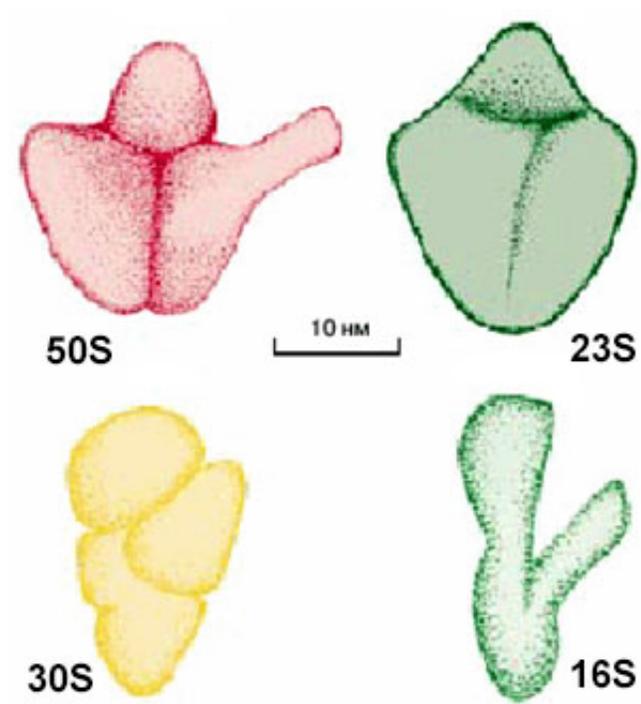


Рис. 10. Анализ ЭМ рибосомных субчастиц после обработки 6М LiCl.

Для моделирования РНК в структуре 30S субчастицы использовали интегрированный подход на основе филогенетически определенной вторичной структуры 16S РНК (3, 61), нейтронной карты положения центров масс белков 30S субчастицы (58), химического зондирования рибосомной РНК на разных этапах сборки субчастицы (55, 62, 63) и результатов UV сшивок рибосомной РНК (64) (Рис. 11).

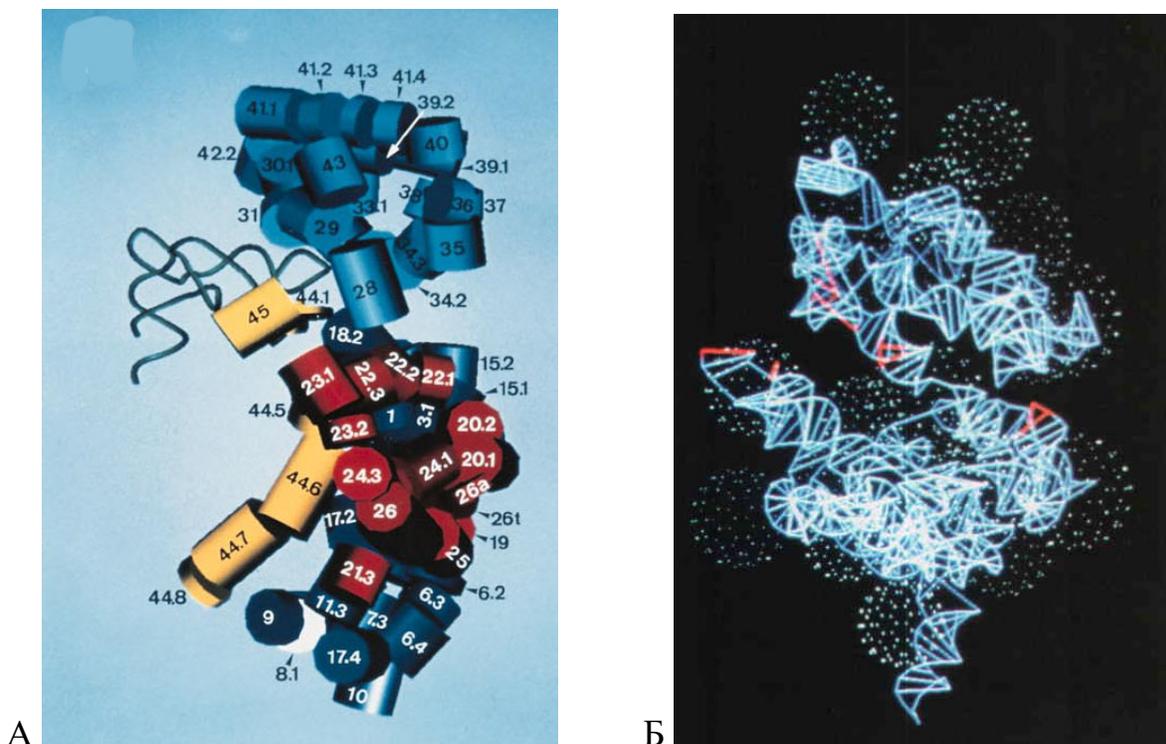


Рис. 11. (А) Идентификация спиралей в модели 16S РНК. Предполагаемое положение Р- тРНК между «телом» и «головой» субчастицы (65). (Б) Модель 16S РНК рибосомной субчастицы. Пунктирные сферы обозначают позиции рибосомных белков, определенных с помощью нейтронографии (см. выше). «Голова» субчастицы находится сверху, а «платформа» слева (66).

1.3. Кристаллизация рибосом

В 1980-х годах были предприняты первые попытки получить трехмерные кристаллы рибосомных субъединиц пригодных для использования рентгено-структурного анализа. Группа Ады Йонат в сотрудничестве с Гюнтером Витманом в Институте Макса Планка в Берлине получили первые кристаллы 50S рибосомных субъединиц, выделенных из *Bacillus stearothermophilus* и *Haloarcula marismortui* (15, 67). Эти пионерские

работы показали возможность исследования рибосом методом рентгено-структурного анализа с атомарным разрешением (68). В это время наша группа работала в институте Белка Академии Наук СССР. Наш проект кристаллографии рибосом был начат в 1984 году как совместная работа между Институтом белка и Институтом Кристаллографии АН СССР.

Сегодня, по прошествии 37 лет после начала проекта, можно с уверенностью сказать, что сложнейшей и наиболее длительной частью проекта, была задача по кристаллизации рибосомы и ее субчастиц. Мы разработали новые методы очистки и кристаллизации рибосом из нового для лабораторных исследований организма *Thermus thermophilus*, который растет в экстремальных условиях, при оптимальной температуре 75°C (6, 69, 70). Эта экспериментальная модель была использована для решения структуры 30S субчастицы (20, 71) и полной рибосомы с функциональными лигандами (18, 19, 24) и по сей день остается полезной моделью для современных кристаллографических и крио-электронномикроскопических исследований механизма трансляции и ее регуляции (72-74).

В методе выделения и очистки рибосом *Thermus thermophilus* принципиальными оказались два этапа. Первый этап – это очистка рибосом через высоко-плотностную подушку, содержащую CsCl и сахарозу, предложенную сотрудником Института белка Зурабом Гогия. Второй этап – это гидрофобная хроматография рибосом на колонке Бутил Тойоперл, предложенную сотрудником Института кристаллографии Сергеем Трахановым, где выделяются плотные пары рибосом, которые оказались пригодными для кристаллизации.

Этот основной протокол, с незначительными изменениями, был использован для кристаллизации трех типов кристаллов рибосом. Первая кристаллическая форма была получена в Институте белка и подтвердила

принципиальную возможность использования рентгеновского излучения для исследования структуры рибосом и ее функциональных комплексов (6, 69, 70). Вторая кристаллическая форма была использована для первого определения структуры рибосомы, содержащей мРНК и тРНК с разрешением 7,8 Å (18), а затем при разрешении 5,5 Å (19, 24). Это исследование было проведено в сотрудничестве с Гарри Ноллером в Центре «Молекулярной биология РНК» в Калифорнийском университете в Санта-Крузе. Третья кристаллическая форма была получена в лаборатории Венки Рамакришнана и использовалась для определения структуры рибосомы с разрешением 2,8 Å (75). Ранее структура рибосомы *Escherichia coli* была определена с разрешением 3,5 Å в лаборатории Джейми Кейта (76).

Наша группа также получила первые кристаллы 30S субчастицы рибосомы *T. Thermophilus* (16, 17). После оптимизации роста кристаллов и условий сбора рентгеновских данных, эта форма кристаллов была использована для первого решения структуры 30S субчастицы в лабораториях Венки Рамакришнана и Ады Йонат (20, 71). Таким же образом кристаллы 50S субчастицы, ранее полученные в лаборатории Ады Йонат (77), после оптимизации роста и сбора данных были использованы Питером Муром и Томасом Штайцем для решения структуры 50S субъединицы из *H. marismortui* (22, 78).

Эти кристаллы отдельных рибосомных субъединиц были также использованы для изучения функциональных комплексов с лигандами мимикрирующими молекулы мРНК и тРНК, а также для исследования декодирующего центра и пептидил-трансферазного центра рибосомы (79, 80). Структуры субчастиц высокого разрешения 30S *T. thermophilus* (20) и 50S *H. marismortui* (22) и экспериментальные карты электронной плотности полной

70S рибосомы содержащие три молекулы тРНК и мРНК были использованы нашей группой для моделирования полной рибосомы *T. Thermophilus* (18, 19).

1.4. Кристаллическая структура бактериальной рибосомы

Все рибосомы состоят из двух субчастиц неодинакового размера. Бактериальные рибосомы имеют коэффициент седиментации 70S и могут быть разделены на большую 50S субчастицу и малую 30S субчастицу. Каждая субчастица рибосомы состоит из РНК (рРНК), это две трети массы субчастицы, и рибосомных белков, одна треть массы. Большая субчастица 50S содержит как 5S (120 нуклеотидов) так и 23S рРНК (около 2900 нуклеотидов), в то время как малая субчастица 30S содержит только одну 16S рРНК (приблизительно 1500 нуклеотидов). Белковая часть 30S субчастицы состоит из 21 индивидуального белка, а 50S субчастица содержит 33 белка (1).

Трехмерные формы рибосомы 70S и субчастиц были охарактеризованы разными методами электронной микроскопии в 1980-е годы (8, 9). В общей морфологии малой субчастицы были выделены такие основные блоки названные «голова малой субчастицы», «тело субчастицы», содержащие такие образования как «плечо» и «платформа». При этом структурный элемент перехода «головы субчастицы» в «тело» был назван «шеей малой субчастицы» (Рис. 4-7). Большая субъединица представляет собой более компактную конструкцию, состоящую из округлого основания с тремя выпуклостями, названными «L1 выступ», «центральная выпуклость» и «стебель L7/L12». Значительное улучшение разрешения было достигнуто в 1990-е годы с введением метода реконструкции изображений полученных с помощью криоэлектронной микроскопии (10).

С появлением кристаллографических структур рибосомных субчастиц высокого разрешения стало возможным интерпретация структур низкого

разрешения (20, 22, 71). Например, выступ на «голове» маленькой субъединицы состоит исключительно из спирали h33 или «центральная выпуклость» большой рибосомной субчастицы состоит из 5S рРНК, части 23S рРНК, а также рибосомных белков L5, L18, L25, и L33. Более подробный анализ структур субчастиц позволяет выявить назначение доменов вторичной структуры рРНК. Например, 5' - домен 16S РНК образует «тело» малой рибосомной субчастицы, средняя домен 16S РНК образует «платформу», а 3' – домен образует «голову» малой субчастицы. В отличие от организации малой рибосомной субчастицы, рРНК большой субчастицы имеет гораздо более компактную переплетенную третичную структуру. В целом кристаллическая структура рибосомы подтвердила правильность предсказанной вторичной структуры рибосомных РНК (Рис. 12, 13) (19).

Таким образом, решение кристаллических структур бактериальных рибосомных субчастиц привело к описанию более 50 структур индивидуальных рибосомных белков. Особая особенность большинства рибосомных белков - это наличие глобулярного домена, который обычно привязан к поверхности субъединицы, а также длинная неструктурированная аминокислотная последовательность, которая проникает глубоко во внутрь структуры субчастицы. Центр рибосомы, так называемое «ядро» состоит из рибосомной РНК (Рис. 12, 13). Анализ структур показал, что рибосомные белки связываясь с разными спиралями рРНК, таким образом соединяют различные структурные домены между собой.

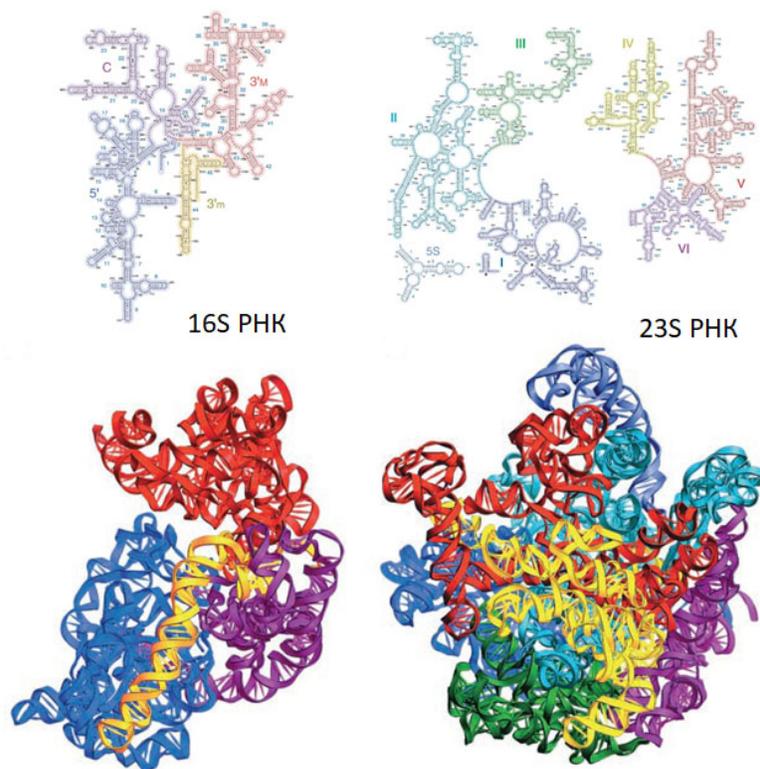


Рис. 12. Сверху вторичная структура 16S РНК и 23S РНК. Снизу третичная структура 16S РНК и 23S РНК. РНК домены вторичной и третичной структуры окрашены в одинаковый цвет.

Пожалуй одним из самых больших сюрпризов анализа кристаллической структуры субчастиц явилось отсутствие рибосомных белков на контактной поверхности субчастиц, что означало, что функциональные центры рибосомы организованы только из рибосомальной РНК. Ранее предполагалось, что энзиматическая активность рибосомы обеспечивается именно белками по аналогии с клеточными ферментами. Впервые отсутствие рибосомных белков на контактной поверхности субчастиц было показано нами в 1986 году прямым методом тритиевой бомбардировки поверхности рибосом (14).

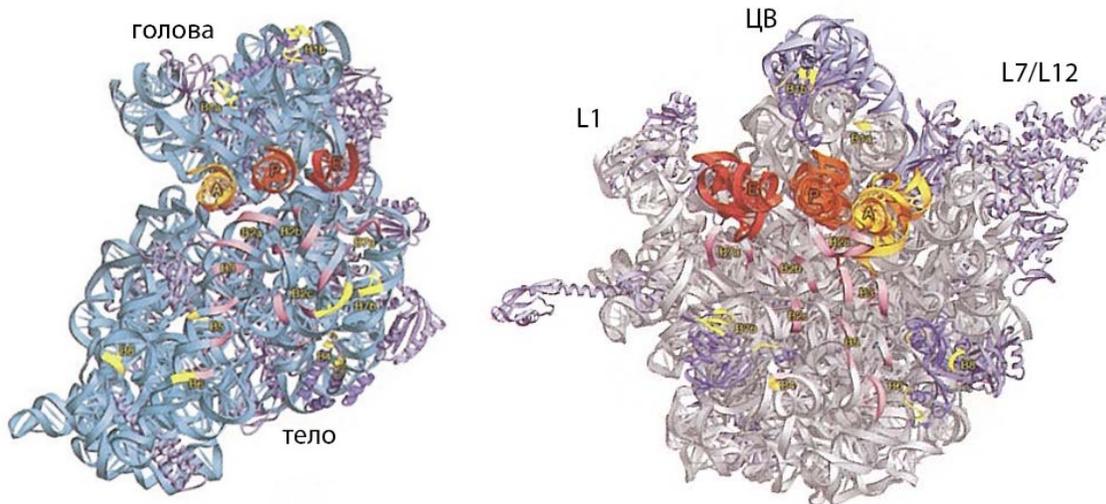


Рис. 13 Структура рибосомных субчастиц *Thermus thermophilus* по данным рентгеноструктурного анализа (19) . Вид внутренней поверхности субчастиц с тРНК в А, Р и Е связывающих участках.

1.5. Функциональные центры рибосомы

1.5.1. Декодирование.

Наиболее важным для понимания механизма декодирования генетической информации является вопрос, как взаимодействует рибосома со своими субстратами, а именно с матричной РНК и тРНК. В дополнение к кодон антикодонным взаимодействиям между тРНК и мРНК, эти главные функциональные лиганды взаимодействуют с определенными участками рибосомы. Эти взаимодействия не только помогают стабилизировать связывание тРНК с рибосомой, но также участвуют непосредственно в функциональных процессах, таких как механизмы дискриминации, что увеличивает точность выбора аминокислот-тРНК, поддержание правильной рамки считывания на мРНК, транслокации тРНК и мРНК внутри рибосомы и

катализ образования пептидных связей. Знание молекулярных контактов между тРНК и мРНК с рибосомой таким образом помогают объяснить механизмы этих процессов.

На основании первых исследований участка связывания aa-тРНК на рибосоме был предложен механизм декодирования, который уточнялся в дальнейшем. Вначале, с помощью биохимических и генетических экспериментов было показано участие нуклеотидов 16S РНК А1492, А1493 и G530 в стабилизации кодо-антикодового дуплекса (81), названных впоследствии « декодирующие» нуклеотиды. Затем методом ЯМР была решена структура РНК фрагмента декодирующего участка в комплексе с антибиотиком парамомицином (29). Далее, решение структуры 30S рибосомной субчастицы с короткими олиго РНК, имитирующие антикодонную петлю тРНК и кодон мРНК, позволило авторам предложить модель третичной структуры декодирующего участка (Рис. 14) (80).

Интересно отметить, что субчастицы в кристалле упакованы таким образом, что одна из петель 16S рРНК (спираль 6) одной субчастицы ориентирована в Р участок соседней субчастицы, как антикодонная петля Р-тРНК. В тоже время 3' - конец 16S РНК субчастицы оказался обращенным во внутрь и занимал позицию матричной РНК в Р участке. В кристалле получилась упаковка «мимикрирующая» комплекс 30S субчастицы с фрагментом мРНК и антикодонной петлей тРНК. Последующее решение структуры высокого разрешения полной бактериальной рибосомы с длинной мРНК и полной молекулой тРНК подтвердили правильность позиций нуклеотидов 16S РНК А1492, А1493 и G530 в декодирующем участке (75, 82, 83). Однако выяснилось, что такая модель кристаллов 30S рибосомной субчастицы имеет довольно значительные ограничения: ее можно было использовать только для интерпретации структуры декодирующего участка,

когда дуплекс кодона мРНК и антикодона «правильный». Дальнейшее использование этих кристаллов для более детального изучения механизма декодирования привело к ошибкам в интерпретации, которые были обнаружены при использовании полной 70S рибосомы с ковалентно целостной матричной РНК и полной тРНК (84). В этих следующих экспериментах изучался механизм селекции правильной тРНК от неправильной, т.е. когда дуплекс кодона мРНК и антикодона не соответствовал правильной геометрии Ватсон-Крик спирали.

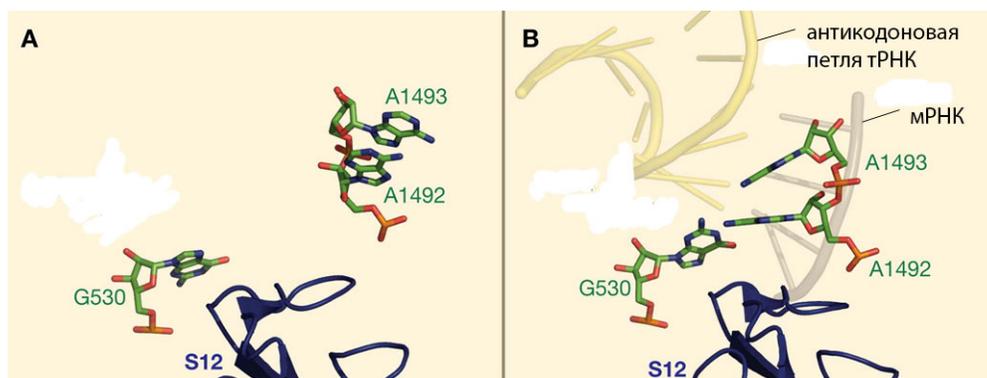


Рис. 14. Структура декодирующего участка и кодон-антикодонного дуплекса. Три нуклеотида 16S РНК A1492, A1493 и G530 меняют ориентацию при связывании тРНК в А участок и стабилизируют кодон-антикодонный дуплекс.

1.5.2. Пептидил-трансфераза.

Наиболее значимым результатом, полученным в результате изучения кристаллических структур большой субчастицы рибосомы и ее субстратных комплексов, является открытие, демонстрирующее, что рибосома является РНК ферментом - рибозимом. Все компоненты рибосомы, участвующие в ориентации как α -аминогруппы А-тРНК, так и связанного с Р-тРНК

карбонильного углерода, который он должен атаковать, состоит из РНК, как и остальная часть пептидилтрансферазного центра (Рис. 15) (79).

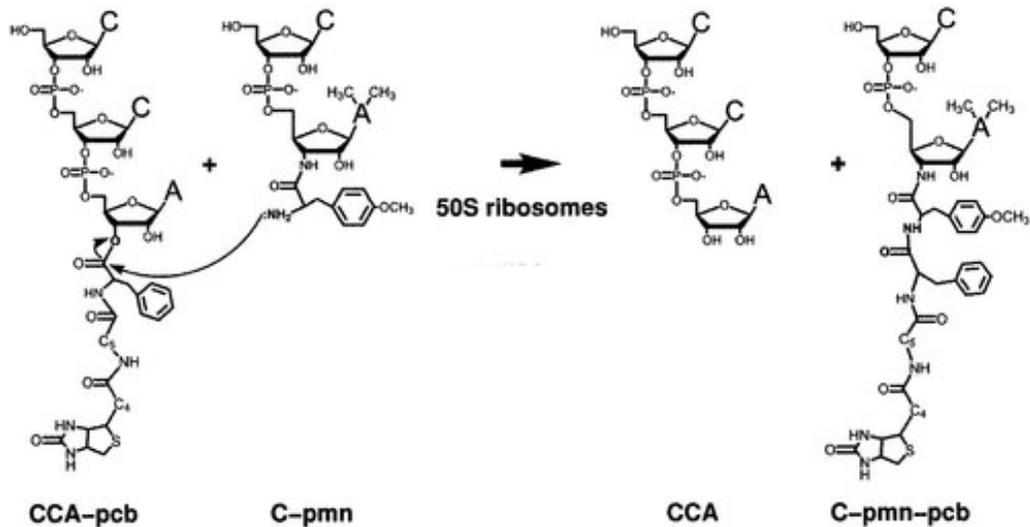


Рис. 15. Пептидилтрансферазная реакция на рибосоме. Нуклеофильная α -аминогруппа аминацил-тРНК, связанная с участком А пептидилтрансферазного центра, атакует карбонильный углерод сложноэфирной связи, связывающей пептидную часть пептидил-тРНК, связанную с участком Р пептидилтрансферазного центра. В результате получается деацилированная тРНК в Р участке и связанная с А участком пептидил-тРНК с дополнительной аминокислотой.

Механизм реакции транспептидации был предложен на основании исследований структуры 50S субчастицы *Haloarcula marismortui* и ее комплексов с лигандами. Полная молекула тРНК является слишком большим лигандом для связывания с отдельной 50S субчастицей. Для комплекса был использован малый аналог субстрата, представляющий собой фрагмент акцепторного ССА конца тРНК и пуромицина, антибиотика, который является субстратом А участка (79). Для начала реакции транспептидации

рибосомы акцепторная тРНК и пептидил тРНК должны иметь строгую ориентацию в ПТЦ, что достигается путем Уотсон-Крик взаимодействий между ССА концами двух тРНК с нуклеотидами G2251 и G2252 в Р участке ПТЦ (Р петля) и G2553 в А участке ПТЦ (А петля). A2451 находится между А и Р петлями и формирует водородную связь с α -аминогруппой аминокислотного остатка акцепторной тРНК. Такое расположение донора и акцептора в ПТЦ приводит к спонтанной реакции транспептидации, после которой тРНК в А участке становится несущей пептид с дополнительным аминокислотным остатком (Рис. 15).

1.5.3. Транслокация тРНК и матрицы.

Во время синтеза белка, мРНК и тРНК скоординированно перемещаются в рибосоме. Крупномасштабные и локальные перестройки внутри рибосомы сопровождают это передвижение лигандов. Александр Спирин впервые предложил механическую модель для транслокации тРНК (85), модель «схлопывающейся рибосомы». До настоящего времени понимание молекулярного механизма транслокации, тем не менее, остается неполным, несмотря на довольно полное понимание структуры рибосомы и расположение ее лигандов.

В настоящее время модель транслокации с переходными состояниями рибосомы, или модель гибридных состояний, или гибридная модель является наиболее обоснованной и подтверждаемой современными экспериментами (2, 86, 87). Исследователи продолжают искать рибосомные комплексы, чтобы проследить этапы синхронного продвижения матрицы и тРНК последовательно из А в Р и далее в Е участок. Этот процесс транслокации катализируется элнгационным фактором EF-G, где происходят

крупномасштабные молекулярные движения в рибосоме, включая вращательные движения тела и головы 30S субчастицы (Рис. 16) (88).

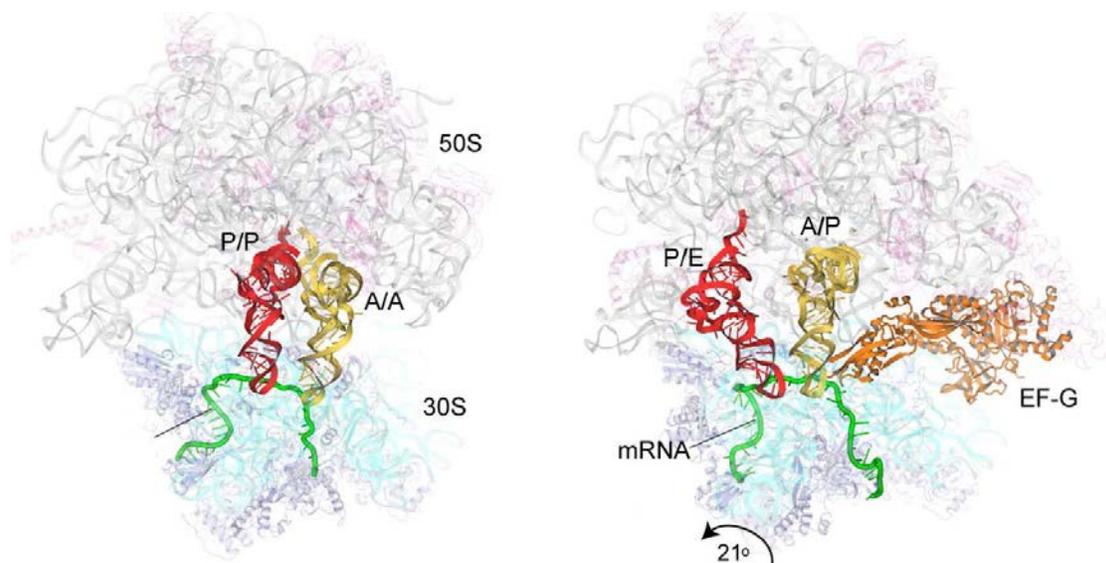


Рис. 16. Структура промежуточного состояния транслокации, содержащего фактор EF-G, мРНК и две частично транслоцированные тРНК. Слева рибосома 70S с тРНК, связанные в классических состояниях А/А и Р/Р. Справа промежуточный комплекс, показывающий тРНК, в промежуточных гибридных состояниях А/Р и Р/Е. Стрелка показывает направление движения головы 30S субчастицы.

Во время транслокации мРНК продвигается на один кодон, что связано с перемещением тРНК из А (аминоацил) участка рибосомы в Р (пептидил) участок и из Р участка в Е (выход) участок, в процессе, катализируемом фактором элонгации EF-G (89). Сначала, тРНК перемещаются по субчастице 50S в гибридные состояния Р/Е и А/Р, за которыми следует перемещение антикодоновых петель тРНК из участков 30S субчастицы А и Р в участки Р и Е соответственно, сопряженное с перемещением их ассоциированных кодонов мРНК (90). Первый шаг сопровождается вращением малой субчастицы

относительно большой субчастицы (91), в то время как второй шаг требует участия EF-G·GTP и включает вращение головного домена 30S субчастицы Рис. 16 (76).

1.6. Антибиотики.

Рибосомный синтез белка в клетке является ключевой мишенью для антибиотиков. Были выявлены антибиотики, ингибирующие почти все этапы трансляции. Поэтому, исследования действия антибиотиков дают не только представление о механизме ингибирования, но и средство для исследования фундаментального механизма синтеза белка. Антибиотики - это химические вещества, которые вырабатываются одним организмом, чтобы убивать другой организм. На сегодняшний день, антибиотики представляющие все основные классы, нацеленные на рибосомы, были исследованы в комплексе с бактериальными рибосомами или их рибосомными субчастицами с помощью рентгено-структурного анализа. Эти структуры показали, что антибиотики преимущественно связываются с консервативными функциональными участками бактериальной рибосомы, включая тРНК-мРНК связывающие участки малой субчастицы (Рис. 17), а также ПТЦ и пептидный туннель большой субчастицы (Рис. 18), (92, 93).

Существует группа антибиотиков, которые ингибируют первый этап элонгации - связывание тРНК с рибосомой. Наиболее изученные это аминогликозиды и тетрациклины.

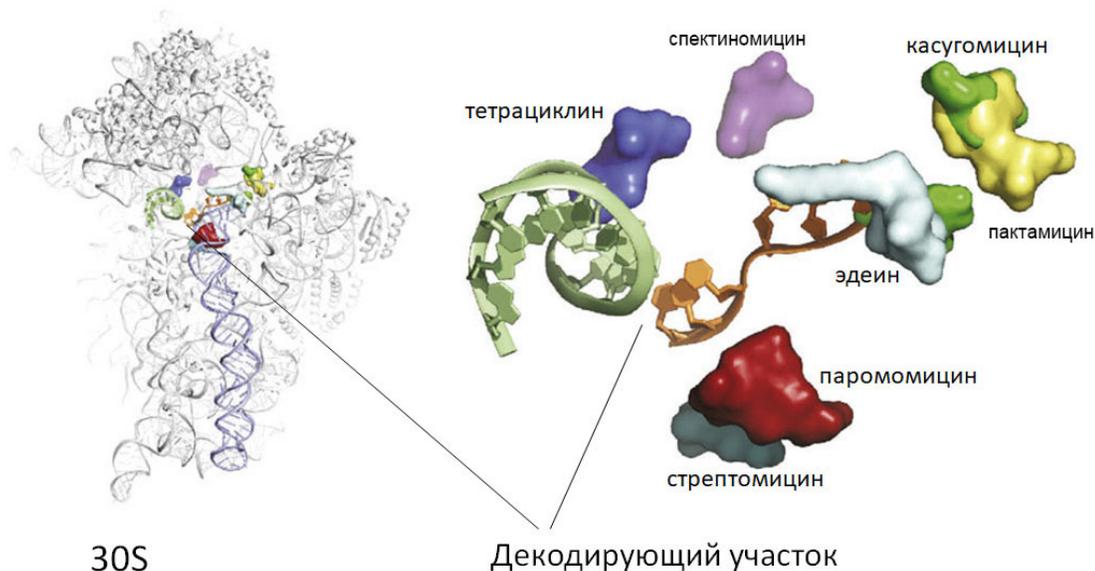


Рис. 17. Антибиотики, связывающиеся в декодирующем участке. Слева контактирующая сторона малой субчастицы. Справа декодирующий участок. Антикодonoвая петля тРНК изображена зеленым цветом. Матричная РНК изображена коричневым цветом.

Аминогликозиды, такие как стрептомицин, неомицин, паромомицин, гентамицин и другие, имеют общую структурную основу с модификациями (Рис. 17). Известно, что обработка бактерий аминогликозидами приводит к ложному кодированию и к синтезу пептидов с включением аминокислот, отличающихся от закодированных в геноме (94). Механизм декодирования исследовался с помощью этих антибиотиков (29, 90, 95-97). Структурные исследования также помогли объяснить природу дискриминации аминогликозидом рибосом бактерий и цитоплазматических рибосом человека (Рис. 18). Нуклеотидные замены в спирали 44 у эукариот исключают связывание антибиотика в декодирующем участке рибосомы.

Тетрациклин прямо ингибирует связывание тРНК с А участком рибосомы. Кристаллографические исследования комплексов тетрациклина и 30S субчастиц одной группой исследователей показали 2 центра связывания (96), а другая группа обнаружила 6 центров связывания (98). В обоих случаях был показан единый главный центр связывания, но обнаружение вторичных центров затрудняло дать однозначную интерпретацию механизма ингибирования трансляции. Позже, использование в качестве модели более целесообразного комплекса, содержащем полную 70S рибосому и главные функциональные лигады такие как мРНК и тРНК, (99), продемонстрировало связывание одной молекулы тетрациклина на рибосому в центре связывания А-тРНК (Рис. 17).

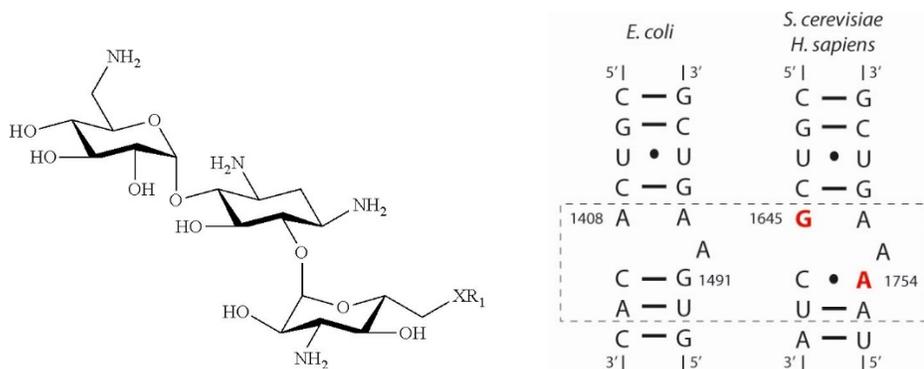


Рис. 18. Базовая структура аминогликозидов. Участок связывания аминогликозидов на спирали 44 рибосомной 16S РНК обозначена пунктиром.

Пурамицин это ингибитор второго этапа элонгации и также инструмент для изучения реакции пептидилтрансферазы. Пурамицин структурно имитирует терминальную аминоксил-аденозиновую часть аа-тРНК. Он действует как акцептор в реакции образования пептидных связей для высвобождения зарождающегося пептида из пептидил-тРНК и рибосомы.

Исторически сложилось так, что классические определения понятия «А» и «Р» участков выводятся из неспособности или способности соответственно, аминоацил- или пептидил-тРНК к реакции с пурамином. Пурамицин это универсальный ингибитор, механизм действия которого подчеркивает универсальность функционирования рибосомы у прокариот и эукариот. Визуализация аналогов пурамицина с помощью кристаллографического анализа привело к определению точного места действия пурамицина и позволило предложить атомарный механизм формирования пептида. Эти структуры показывают, что активный участок рибосомы состоит исключительно из рРНК, хотя присутствует «хвост» рибосомного белка (bL27 в бактериях и eL10 в эукариотах), который контактирует с ССА концом Р-тРНК и таким образом может способствовать позиционированию субстратов.

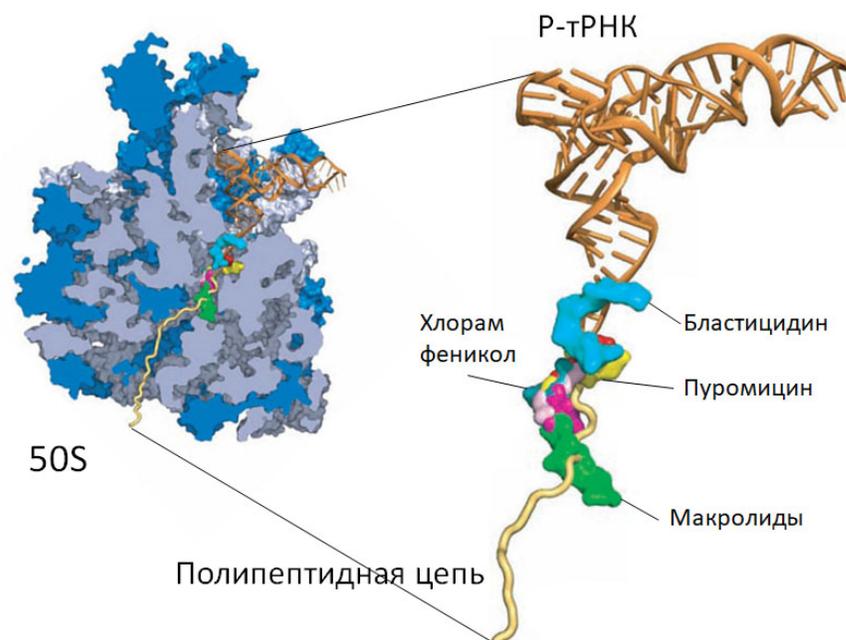


Рис. 19. Антибиотики, связывающиеся в ПТЦ. Бластицидин и Пуромицин имитирует ССА-конец тРНК. Хлорамфеникол перекрывается с аминокцил-тРНК, связанной с А-участком и контактирует с А76 тРНК в Р-участке. Макролиды связываются внутри туннеля 50S субчастицы.

Бластицидин S имитирует деацелированный ССА-конец Р-тРНК, таким образом связывается в ПТЦ рибосомы (Рис. 19). Бластицидин S является производным нуклеозида, как и пурамицин, но отличается от пурамицина имитирующего аминокцилированный аденозин (А76) А-тРНК.

Хлорамфеникол – наиболее изученный антибиотик пептидилтрансферазного центра 70S рибосомы (Рис. 19). Он связывается в А-участке ПТЦ бактериальной рибосомы перекрываясь с аминокцилом тРНК и непосредственно контактирует с рибозой А76 Р-тРНК. Присутствие хлорамфеникола на рибосоме мешает связыванию тРНК в А и Р участках.

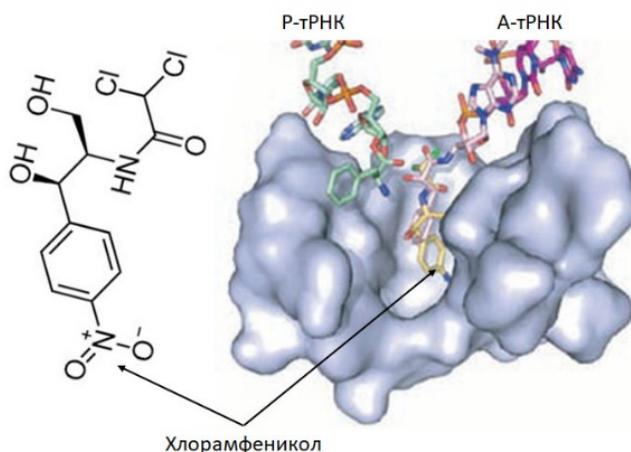


Рис. 20. Хлорамфеникол связывается в пептидилтрансферажном центре.

Макролиды представляют собой большой класс поликетидных соединений синтезируемых актиномицетами, которые ингибируют бактериальный, но не архейный и не эукариотический синтез белка. Макролиды антибиотики связываются в месте прилегающем к ПТЦ, расположенному внутри туннеля большой рибосомной субчастицы, через который проходит полипептидная цепь во время трансляции (Рис. 20).

Третий этап элонгации – транслокация мРНК на три нуклеотида в 5' направлении, А-тРНК в Р-участок и Р-тРНК в Е-участок. Антибиотики спектиномицин, пактамицин, касугамицин и эдеин ингибируют этот процесс (Рис. 17). Касугамицин и эдеин препятствуют трансляции мРНК в бактериях, связываясь в Е-участке мРНК. Пактамицин был выделен и изучен как потенциальное противоопухолевое средство. Впоследствии было доказано, что он одинаково эффективен против бактерий и эукариот, и таким образом не может быть использован в качестве противомикробного средства. Спектиномицин «замораживает» рибосомы в гибридном состоянии транслокации путем предотвращения вращения «головы» малой субчастицы, необходимой для движения тРНК и мРНК в Р-и Е-участки.

1.7. Заключение.

В 1980-е годы две группы лабораторий в Институте Макса Планка в Западном Берлине и в Институте белка АН СССР создали биохимическую основу для решения структуры рибосомы методом рентгено-структурного анализа. Были получены трехмерные кристаллы 50S рибосомных субчастиц, выделенных из *Bacillus stearothermophilus* и *Haloarcula marismortui* (15, 67) в Берлине. Кристаллы 30S рибосомных субчастиц и полных 70S рибосом из *Thermus thermophilus* были получены в Пущино (6, 69). Успешная кристаллизация рибосом в обоих случаях основывалась на правильном выборе

микроорганизма для выделения рибосом, а также существовании общей развитой методологии работы в области рибосомного биосинтеза белка в этих институтах, где был накоплен многолетний опыт работы с индивидуальными рибосомами *in vitro*, представляющими функциональный макромолекулярный комплекс. Поиск объекта, условий кристаллизации, условий сбора кристаллографических данных и решения структуры занял около 15 лет. Параллельно с развитием таких гигантских инфраструктур как синхротроны, новых поколений компьютеров, развитием программного обеспечения, Томас Штайц предложил путь для решения кристаллографической задачи рибосомы (100), метод ранее разработанный Майклом Росманом для решения структуры вирусов (101). Был применен метод молекулярного замещения с использованием структур рибосом, полученных методом крио-электронной микроскопии. Этот подход позволил получить атомарные структуры рибосомных субчастиц (20, 22, 71), первое решение полной рибосомы в комплексе с главными функциональными лигандами (мРНК и тРНК) и позже атомарную структуру полной рибосомы (75, 76, 82).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы и биопрепараты

Лактимидомицин был предоставлен Джоном Лю (Johns Hopkins Medical Институт),

Эдеин был предоставлен Дэниэлом Уилсон (генный центр Мюнхена),

Токсин Т-2 был предоставлен Полом Хейзендонк (Agriculture and Agri-Food Canada), Ликорин, гомогаррингтонин и нарциклазин был из Санта-Крус Биотех,

Анизомицин А, пактамицин, бластицидин S, циклогексимид, генетицин (G418), веррукарин А и дезоксиниваленол были из Сигма-Олдрича,

Криптолейрин, нагилактон С и филлантозид были предоставлены компанией NIH / NCI Developmental Therapeutics,

ССА три-нуклеотидных был приобретен у компании Dharmacon Thermo Scientific.

В работе также использовали следующие реактивы: 1,4-дителиотреитол (ДТТ), 2-меркаптоэтанол, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), бромфеноловый синий, ксиленцианол, додецилсульфат натрия, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, мочевиная, сахароза, персульфат аммония, ацетат натрия, хлорид аммония, хлорид натрия, борная кислота, трихлоруксусная кислота, глицерин, дрожжевой экстракт и бакто-триптон (DIFCO lab), спермин и спермидин (Сигма), пактамицин, анизомицин и криптолейрин (ИГМКВ).

В работе использовали ферменты фирм: Promega (США), Gibco BRL (США), GE

Healthcare (США), New England Biolabs (Англия), Roche (Франция).

2.2. Буферы и растворы.

YPAD среда для выращивания дрожжей: Vacto yeast extract (Difco) (1%), Vacto peptone (Difco) (2%), Glucose (2%), Adenine sulfate (0.004%)

Буфер М для разрушения клеток дрожжей: 30 mM Hepes-K pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 8.5% маннит, 2 mM DTT, 0.5 mM ЭДТА

Буфер А для градиента сахарозы: 20 mM Hepes-K pH 7.5, 120 mM KCl, 8.3 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.3 mM EDTA)

Буфер Г для хранения рибосом: 10 mM Hepes-K, pH 7,5, 5 mM Mg(As)₂, 50 mM KAc, 10 mM NH₄Cl, 2 mM ДТТ

Буфер Г2 для кристаллизации рибосом: 5.5 mM Tris-As pH 7.0, 2.5 mM Hepes-K pH 7.5, 3.33 mM Mg(As)₂, 40 mM KAc, 2.5mM NH₄Cl, 5.5 mM NH₄Ac, 2.8 mM Deoxy Big Chap, 2mM ДТТ, 0.055 mM ЭДТА

Буфер Р для кристаллизации (резервуар) 4.5% ПЭГ 20К, 100 mM Tris-As pH 7.0, 5mM спермидин, 3 mM Mg(As)₂, 100 mM KSCN and 20% глицерин.

Буфер Г3 для обезвоживания кристаллов: 80mM Tris-As pH 7,0, 70 mM KSCN, 10 mM Mg (As)₂, 20% глицерин, 5% PEG 20,000, 6,5mM спермидина, 7.5 mM NH₄Ac, 1.4 mM Deoxy Big Chap, 2 mM ДТТ, 5 -20% PEG 6000.

Буфер Г4 для ко-кристаллизации рибосом с ингибиторами: 5.5 mM Tris-As pH 7.0, 2.5 mM Hepes-K pH 7.5, 3.33 mM Mg(As)₂, 40 mM KAc, 2.5mM NH₄Cl, 5.5 mM NH₄Ac, 2mM ДТТ, 0.055 mM ЭДТА

Растворы для электрофореза:

ТВЕ: 100 мМ Tris-HCl; 100 мМ H₃BO₃; 2 мМ EDTA.

Агарозные гели: 1-2% агарозы в буфере ТВЕ, 0,05 мкг/мл этидийбромид.

Буфер для нанесения: 0,1% бромфеноловый голубой, 50% глицерин, ТВЕ.

Полиакриламидные гели для разделения РНК: 4-15% полиакриламид в смеси с 1/20 бисакриламида, 420 г/л мочевины, ТВЕ, 0,1% персульфат аммония,

0,1% TEMED.

Буфер для нанесения РНК: 0,1% бромфеноловый голубой, 0,1% ксиленцианол,

ТВЕ, 420 г/л мочевины.

Буфер для нанесения продуктов обратной транскрипции: 0,1% бромфеноловый

голубой, 0,1% ксиленцианол, 20 мМ EDTA, 98% формамид.

Буфер для прокрашивания РНК: 0,2% метиленовый синий, 0,4 М NaOAc pH 5.5.

буфер GES для элюции из геля: 50мМ Tris-HCl (pH 7.5), 0,1% SDS, 2мМ EDTA,

100мМ NaOAc.

Полиакриламидные гели для разделения белков:

Разделяющий: 12% полиакриламид в смеси с 1/30 бисакриламида, 0,375 М Tris-

HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,03% TEMED.

Концентрирующий: 5% полиакриламид в смеси с 1/30 бисакриламида, 0,125 М

Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,03% TEMED.

Буфер для электрофореза: 25 mM Tris, 250 mM глицин, 0,1% SDS.

Буфер для нанесения: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% бромфеноловый голубой, 10% глицерин.

Буфер для прокрашивания белков: 0,25% кумасси голубой R250, 45% этанол, 10% уксусная кислота.

2.3 Выделение рибосом

Штамм *Saccharomyces cerevisiae* JD1370 был получен в лаборатории Джонатана Динмана (Мэрилендский университет, США), где был удален ген вируса L-A. Это двухцепочечный РНК-вирус, который заражает и размножается в дрожжах *S. cerevisiae*. Кроме того, штамм JD1370 содержит делеции ключевых протеаз и РНКаз, которые высвобождаются при лизисе клеток: PEP4 вакуолярной протеазы и митохондриальной нуклеазы NUC1.

Культивирование дрожжей проводили в колбах в стандартной среде YPAD из свежей одиночной колонии выращенной на твердой среде. 4 колбы на 5 литров с 1 литром среды при температуре 30°C и 180 качков в минуту. Клетки собирали центрифугированием, когда оптическая плотность при 600нм достигала 1,4-1,5.

Процедура глюкозного голодания. Глюкозное голодание использовалось для получения моно рибосом в естественных условиях путем остановки инициации трансляции. Всего через несколько минут все транслирующие рибосомы переходят из полисом в неактивные моносомы (102). Клетки дрожжей суспендировали в среду YP (без глюкозы) и инкубировали при температуре 30°C в течение 10 минут. Клетки собирали центрифугированием, дальнейшие шаги выполнялись при 4°C. Клетки

промывали буфером М. Как правило, получалось 4,5 грамма клеток из 4L культуры.

Разрушение клеток. Клетки суспендировали в 6,5 мл буфера М и добавляли 600 мкл коктейля ингибиторов протеазы (PIC, Roche), 100 мкл RNasin (Promega), 120 мкл Pefablock 100 мМ и 56 мкл Na-гепарина 100 мг/мл. Было обнаружено, что концентрация гепарина увеличивает растворимость рибосом, таким образом влияя на количество ПЭГ, который потребуется на последующих стадиях осаждения рибосом. Клетки разрушаются стеклянными шариками встряхиванием вручную пробирки с клеточной суспензией 5 раз в течение 1 минуты с минутными перерывами во льду между каждым встряхиванием (103). Этот подход был первоначально использован для выделения митохондрий дрожжей и введен здесь, чтобы избежать загрязнения митохондриальными рибосомами. Все дальнейшие шаги требуют быстрой работы на льду. Шарики удаляются коротким центрифугированием (20 000 об/мин, 2 мин) и клеточный экстракт дополнительно осветляется центрифугированием (31 000 об/мин, 9 мин).

Очистка полиэтиленгликолем. Далее клеточный экстракт подвергают дифференциальному осаждению ПЭГ. Этот шаг используется для обогащения рибосомосодержащей фракции. Использовали исходный 30% раствор 20 000 ПЭГ (Хамптон), добавляя до конечной концентрации 4,5% для первого фракционирования. Раствор осветляли центрифугированием (20 000 об/мин, 5 мин), надосадочную жидкость собирали. Повышали концентрацию KCl до 130 мМ. Далее повышали концентрацию 20 000 ПЭГ для второго фракционирования до концентрации 8,5%. Осадок рибосом собирали (17 500 об/мин, 10 мин), супернатант удаляли и рибосомы ресуспендировали (6,5-7 мг / мл) в буфере М2, который состоит из буфера М с концентрацией KCl

повышенной до 150 мМ и дополнительными ингибиторами протеазы и гепарина. На этой стадии, как правило, 30-35 мг рибосом получают из 4,5 грамм дрожжевых клеток.

Градиент сахарозы. Рибосомы дополнительно очищаются на 15-30% градиенте сахарозы в буфере А, Ротор SW28 (18 000 об / мин, 15 ч). Фракции, соответствующие рибосомам, объединялись и концентрацию КСl и MgCl₂ доводили до 150 мМ и 10 мМ соответственно. Рибосомы осаждали ПЭГ 20 000 добавляя в объединенные фракции рибосом до конечной концентрации 7%. Осадок рибосом собирали центрифугированием (17 500 об/мин, 10 мин) и суспендировали в буфере Г до конечной концентрации рибосом 20 мг/мл. Как правило, 14-19 мг рибосом получалось из 4,5 граммов клеток.

Целостность рибосом проверяли электрофорезом белков и РНК.

2.4. Электрофорез белков в SDS-ПААГ

Собирали камеру для заливки SDS-ПААГ Mini-Protean II фирмы Bio-Rad, заливали 12% разделяющий гель, на который наслаивали 1 мл воды. После полимеризации разделяющего геля, выливали верхний слой воды и заливали концентрирующий гель, в который вставляли “гребенку” для образцов. После полимеризации концентрирующего геля наносили образцы (5-20 мкг 80S рибосом на слот) предварительно прогретые в течение 5 мин при 95°C . Электрофорез проводили в буфере для электрофореза при напряжении 90V до прохождения бромфенолового синего до конца геля. После проведения электрофореза гель помещали в ванночку с раствором для прокрашивания белков и инкубировали при небольшом покачивании 1–16 ч. Затем гель переносили в отмывочный раствор того же состава, что и раствор для

прокрашивания белков, только без красителя, и отмывали до проявления белковых зон.

2.5. Выделение рРНК для электрофореза

К 1 мл 80S рибосом с концентрацией 1 мг/мл или рибосомных субчастиц добавляли равный объем буфера для экстракции РНК. Проводили экстракцию равным объемом фенола, осаждали рРНК этанолом -20°C 1 час, центрифугировали 14000 об/мин 15 минут, полученный осадок промывали 70% [v/v] этанолом, высушивали в вакууме, растворяли рРНК в воде и определяли оптическую плотность A_{260} .

2.6 Электрофорез рРНК в денатурирующем ПААГ

рРНК проверяли электрофорезом в 8% ПААГ. В качестве электродного буферного раствора использовали ТВЕ. Предварительно проводили преэлектрофорез при силе тока 20 мА в течение получаса. Электрофорез проводили при силе тока не более 20 мА до полного прохождения красителя бромфенолового синего через гель. Зону, содержащую РНК, визуализовали с помощью ультрафиолетовой лампы и экрана, люминесцирующего при облучении ультрафиолетом. РНК была видна как тень на люминесцентном экране.

2.7. Кристаллизация рибосом.

Раствор рибосом перед кристаллизацией инкубировали при температуре 30°C в течение 10 мин и остужали при 4°C . Для кристаллизации 2 мкл рибосом в концентрации 5 мг/мл в буфере Г2 смешивали с 1.6 мкл буфера Р для резервуара. Рибосомы кристаллизовали методом висячих капель

при температуре 4°C. Как правило, кристаллы появлялись в течение 7-10 дней и достигали своего полного размера дополнительно через две недели.

2.8. Обработка кристаллов и заморозка.

Обезвоживание кристаллов улучшила воспроизводимость и качество дифракции. Покровное стекло с кристаллизационной каплей переваривали и помещали в небольшую Чашку Петри (35x10 мм). Маточный раствор кристаллизационной капли заменяли раствором с более высокой концентрацией ПЭГ 20000 в буфере ГЗ. Далее этот раствор был заменен поэтапно, с 15-минутными перерывами, на растворы с возрастающей концентрацией ПЭГ 6000 от 5% до 20%. На последнем этапе добавляли 2 мМ гексамина осмия и каплю держали в чашке Петри, запечатанной парафильмом, в течение от 30 мин до 5 часов.

Кристаллы замораживали в потоке холодного азота.

2.9. Сбор кристаллографических данных.

Дифракционные данные были собраны с кристаллов охлажденных до 90К на пучке X06SA синхротрона SLS (Швейцария). Мы использовали стратегию сбора данных, разработанную на SLS, которая использует особенности однофотонного счетного пиксельного детектора PILATUS 6M. Рентгеновский пучок был ослаблен примерно до 7,5% от максимума, так что радиационные повреждения кристаллов были значительно уменьшены и были собраны многократные наборы данных с нескольких кристаллов.

2.10. Расчет карт, построение моделей и их уточнение.

Для решения структуры методом молекулярного замещения были использованы три кристаллические структуры 30S и 50S *T. thermophilus* и *H. morismortui* (22, 82). Это решение было использовано для определения местоположения молекул осмия III, из которого был рассчитан начальный набор фаз SAD с использованием программы Фазера (104). Координаты атомов были уточнены в программе Phenix (105).

Сравнение с 70S рибосомой со связанными лигандами, а также с изолированной 50S археальной субчастицей было выполнено с использованием суперпозиции наименьших квадратов, предложенная в (106). Была проведена подгонка модели в крио EM карты с целью сравнения, выполненная по алгоритму MOLREP (107). Для поиска структурных гомологов рибосомных эукариотических специфических белков был использован сервер HHRED.

Полученная модель дрожжевой рибосомы с разрешением 4,15 Å (108) была использована в качестве отправной точки для решения полной структуры 80S рибосомы высокого разрешения. Были собраны кристаллографические данные с разрешением 3,0 Å. Начальная модель была улучшена несколькими раундами уточнений в программе Феникс, начиная с 80S рибосомы и заканчивая отдельными доменами (большая субъединица, голова, тело, платформа). Уточненная исходная модель была использована для того, чтобы найти примерно 1400 атомов осмия гексамина с помощью программы Фазера. Электронная плотность рибосомы использовалась для ручного построения модели в программе Соот, которая показала четкую плотность для большинства оснований рРНК и белковых боковых цепей. РНК и белковые цепи исходной уточненной модели были скорректированы. Белки, не

имеющие гомологов в прокариотических рибосомных структурах, были сначала идентифицированы по их размеру, укладке, уникальным особенностям, таким как цинковый палец и построены в соответствие с их последовательностями и электронной плотностью.

2.11. Вымачивание кристаллов рибосом с ингибиторами.

Все ингибиторы были растворены в ДМСО для получения исходных исходных растворов (20-100 мМ). Практически все рибосомо-ингибиторные комплексы и комплекс с олигонуклеотидом ССА вначале проверяли методом вымачивания кристаллов рибосомы с 0,3-0,7 мМ раствором каждого ингибитора в течение 2 ч или 24 ч при 4°C. Далее кристаллы использовали для сбора данных. В случае отсутствия электронной плотности ингибитора в предполагаемом комплексе с рибосомой использовали метод кокристаллизации.

2.12. Ко-кристаллизация рибосом с ингибиторами.

Кристаллы рибосом с ингибиторами также получали в экспериментах по совместной кристаллизации. Образец рибосом был приготовлен при концентрации 5 мг/мл в буфере Г4. Ингибиторы растворенные в ДМСО добавляли в раствор рибосомы в избытке используя два различных соотношения, либо 1: 20, либо 1:50. После гомогенизации раствор инкубировали при температуре 30°C в течение 5 мин. Затем добавляли Deoxy Big Char в конечной концентрации от 2,8 мМ. Конечный раствор перед кристаллизацией охлаждали до 4°C.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Была определена первая кристаллографическая структура полной эукариотической рибосомы с высоким разрешением, что позволило расширить изучение биосинтеза белка и его регуляцию в клетках на атомарном уровне. Функциональные комплексы рибосомы, полученные из бактерий и дрожжей, позволили исследователям определить точные положения нуклеотидов и аминокислотных остатков в различных состояниях функции рибосомы. Эти знания, вместе с исследованиями электронной микроскопии, увеличивают наше понимание того, как протекают основные процессы синтеза белка на рибосоме, включая декодирование мРНК, образование пептидных связей, транслокация мРНК и тРНК, а также послужило толчком к развитию нового большого направления изучающего процесс созревания (биогенез) рибосом.

3.1. Кристаллизация рибосом дрожжей

Кристаллизация эукариотической рибосомы для рентгено-структурного анализа оказалась такой же длительной задачей, как и в случае с бактериальной рибосомой, включающей этапы выбора организма для выделения рибосом и поиск условий кристаллизации. Первые двумерные, а позже трехмерные микрокристаллы эукариотических рибосом были получены из эмбрионов цыпленка (109). Много лет назад, когда мы начали новый проект по решению структуры эукариотической рибосомы, наш поиск организма для выделения и кристаллизации рибосом начался с разработкой системы базирующейся на эмбрионах цыпленка. В результате мы разработали протоколы разрушения клеток, выделения и очистки интактных рибосом, с последующей их кристаллизацией. К сожалению, полученные мелкие

кристаллы рибосом эмбрионов цыпленка оказались не пригодны для рентгено-структурного анализа.

3.1.1. Выделение рибосом для кристаллизации

Основная проблема в кристаллографических исследованиях рибосомы является получение хорошо дифрагирующих кристаллов. Поэтому структурная гомогенность изолированных образцов рибосомы очень важна, так как только такие образцы рибосом могут образовывать хорошо упорядоченные кристаллы. Эта стадия принципиально отличается от подготовки образцов для крио-ЭМ, когда исследователи отбирают частицы сходного типа для определения структуры из уже полученных изображений рибосомных образцов (110).

Мы разработали новые методы выделения и очистки рибосом прокариот и эукариот для кристаллизации. Для изучения прокариот, мы использовали экстремально термофильную бактерию, *Thermus thermophilus*. В начале 1980-х годов мы ввели этот экстремальный термофил в область рибосомной кристаллографии, потому что рибосомы изолированные из этого организма устойчивы к деградации (6). Традиционный способ выделения рибосомных моносом из полисом из бактерий или дрожжей основан на промывке клеточного экстракта высокой концентрацией соли в буфере, содержащем 0,5-1.0 М NH₄Cl, KCl, или CsCl, который удаляет лиганды из рибосомы. Мы разработали протокол очистки 70S рибосом *T.thermophilus*, который включает в себя эту солевую обработку на первом этапе выделения. Чтобы улучшить качество рибосомного образца, мы ввели дополнительный этап, который включает в себя очистку рибосом с помощью гидрофобной хроматографии, где использовалась смола бутил-TOYOPEARL. Мы оптимизировали ионные условия, используемые для хроматографии для получения прочных пар 70S

рибосом. В результате были получены кристаллы 70S рибосом *T.thermophilus*, причем только из образцов очищенных без диссоциации рибосомы на отдельные субчастицы. Оказалось, что диссоциация и ре-ассоциация рибосомы на субчастицы приводит к потере способности препарата образовывать кристаллы. Вероятно диссоциация рибосомы, вызываемая понижением концентрации магния в среде частично разрушает структуру рибосомной РНК, что приводит к гетерогенности препарата. Наш подход выделения рибосом с использованием гидрофобной хроматографии впоследствии был использован в лаборатории Венки Рамакришнана для очистки 30S субчастицы и кристаллизации в условиях, опубликованных ранее (6, 111).

Для разработки метода выделения рибосом из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* мы использовали опыт работы с бастериальными системами. Мы опробовали различные способы очистки в поисках подходящего протокола для выделения дрожжевых рибосом. Традиционный способ выделения эукариотических монорибосом основан на промывке высокой солью. Такие рибосомы не кристаллизуются. Поэтому был использован радикально новый подход, когда была использована очень мягкая обработка рибосом во время выделения (108). Этот «мягкий» протокол выделения гарантирует сохранность структуры рибосом и присутствие ее компонентов. Трудность, с которой мы столкнулись при разработке нового протокола для получения полной 80S рибосомы в ее моносомной форме, заключалась в том, что значительная часть рибосом в клеточных экстрактах дрожжей находится в виде полисом. Чтобы получить моносомную форму рибосом, сохраняя ее целостность, мы воспользовались наблюдением, что глюкозное голодание растущих дрожжевых клеток ингибирует инициацию и вызывает накопление очень однородных монорибосом без каких-либо лигандов (102). В результате

оптимизации лизиса клеток путем встряхивания клеток с помощью стеклянных бусин, затем полиэтиленгликольного фракционирования клеточного экстракта и седиментации рибосом через градиент сахарозы были получены рибосомы для кристаллизации и рентгено-структурного анализа (108, 112).

3.1.2. Выращивание кристаллов рибосом

Рибосомы кристаллизовали методом висячих капель при температуре 4°C. Раствор рибосом при концентрации 5 мг/мл в буфере содержащем неионный детергент Дезокси Big Chap, влияющий на растворимость рибосом, глицерин для замедления роста кристаллов и полиэтиленгликоль 20 000, как осадитель. Перед кристаллизацией, для активации рибосом, раствор инкубировали при температуре 30С. Как правило, кристаллы воспроизводимо появлялись в течение 7-10 дней и достигали своего полного размера через две дополнительные недели. Было обнаружено, что кристаллы большого размера с явными дефектами дают наилучшую дифракцию, скорее всего, обусловленную толщиной кристаллов (Рис. 21).

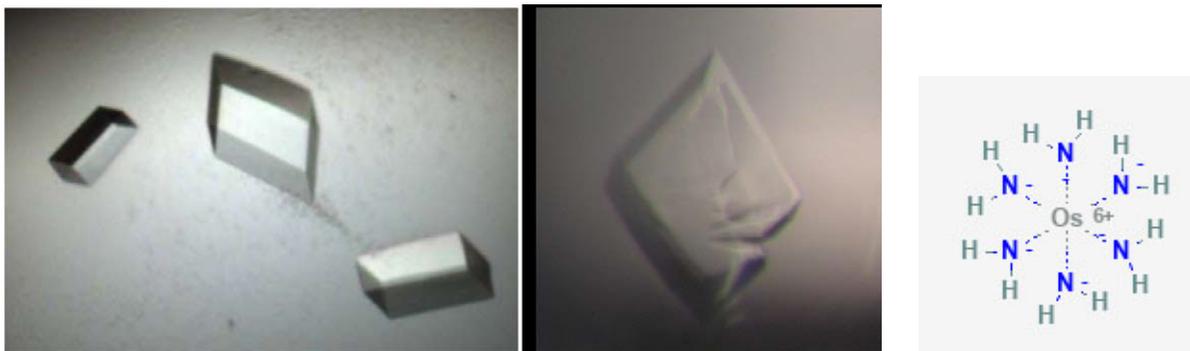


Рис. 21. Кристаллы 80S рибосом *Saccharomyces cerevisiae*, полученные через две-три недели: кристаллы около 200 мкм (слева), крупные около 400 мкм

кристаллы с явными дефектами (справа). Структура гексамин осмия, который использовался в экспериментах аномального рассеяния.

3.1.3. Дегидратация кристаллов и их замораживание

Пост-кристаллизационная обработка используется для улучшения стабильности кристаллов и улучшения их дифракции. Известно, что уменьшение содержания растворителя внутри кристалла приводит к внутреннему упрочнению. Часто это приводит к улучшению дифракции и времени жизни кристалла в рентгеновском пучке. Такая стратегия называется дегидратационная обработка, которая успешно применялась для ряда белков со значительным положительным эффектом (113). Наши эмпирические исследования показали, что различные дегидратационные агенты и вариации протоколов приводят к изменениям упаковки кристаллов рибосом. Например, медленное увеличение ПЭГ-6 000 (без диффузии паров) приводит к самым серьезным последствиям. Такая обработка индуцирует конформационное изменение в рибосоме в кристалле, изменяя степень вращения «головы» и «тела» 40S субчастицы относительно 60S субчастицы. Параметры элементарной ячейки меняются, и дифракция кристаллов достигает высокого разрешения (до 2,5 Å). Оптимизация этой обработки позволила получить высокую воспроизводимость кристаллов с дифракцией высокого разрешения. Окончательная схема обработки включала постепенное повышение концентрации ПЭГ 6000, достигающий в конце, после пяти этапов, 20%. (Рис. 22). Кроме того, на последнем этапе в раствор вводили гексамин осмия ($H_{12}N_6Os$), который был использован в экспериментах аномального рассеяния, который дополнительно укреплял структуру РНК, имитируя полностью гидратированный магний (Рис. 21).

Кристаллы были заморожены в потоке газообразного азота непосредственно у синхротронного пучка.

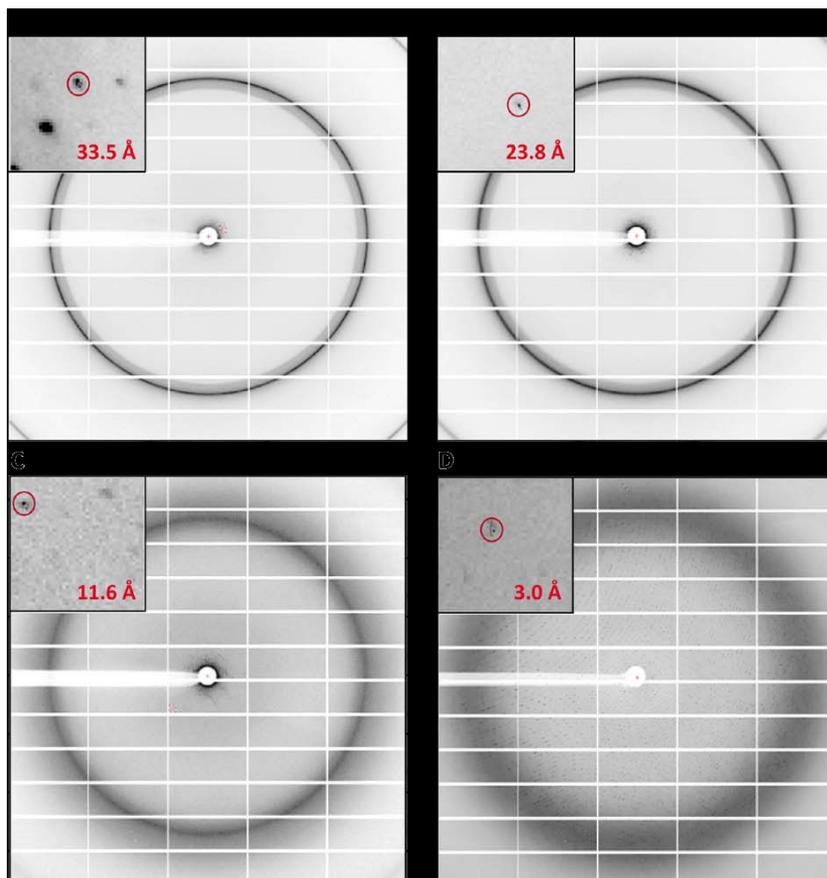


Рис. 22. Эволюция предела дифракции в процессе посткристаллизационных обработок. Эти дифракционные картины были собраны на кристаллах вымоченных в растворах с увеличивающейся концентрацией ПЭГ 6000 и введений гексамина осмия на заключительном этапе: А (1% ПЭГ), Б (5% ПЭГ), В (15% PEG) и Г (20% PEG и 2 мМ осмия гексамина). Лучшая дифракция показана слева в верхнем углу.

3.2. Решение структуры рибосомы

Сбор рентгеновских данных осуществлялся на швейцарском синхротроном источнике SLS. Параметры сбора кристаллографических данных были оптимизированы полуэмпирически на основе стратегии, разработанной на этом синхротроне для детектора нового поколения Пилатус 6М (114). Наиболее важные характеристики Пилатуса в сравнении с другими детекторами: очень низкий уровень шума, отличное разрешение близко расположенных отражений, миллисекундное время считывания информации. В целом, эти характеристики делают PILATUS очень удобным для детального сбора данных. Действительно, было показано, что для слабо диффрактирующих кристаллов и особенно кристаллов, где дифракционный уровень в области фона растворителя, данные измерения улучшают общую статистику (115). Эта стратегия была адаптирована для кристаллов 80S рибосом и расширена за счет комбинации увеличения количества данных и сбора при низкой экспозиции. Таким образом, пучок был изменен до 50x70 мкм, сфокусирован на детекторе и ослаблен до примерно 7,5% его потока, таким образом радиационный ущерб был значительно уменьшен. В таких условиях сбора данных можно было наблюдать дифракционные пятна до 2,5 Å для некоторых кристаллов. Статистика кристаллографических данных представлена ниже

Группа симметрии $P2_1$

Асимметрическая ячейка 2 рибосомы

Элементарная ячейка (Å) 436.4 x 288.2 x 305.1

$\beta = 98.90$

Разрешение (Å) 301.0-3.0 (3.1-3.0)

Количество кристаллов использовано для полного набора 13

Полнота набора 100% (100%)
Rmeas 31.7 (246.3)
Rmrgd-F 12.4 (66.2)
I/σ(I) 14.8 (2.24)
SAD phasing statistics
Тяжелый атом Osmium hexamine (III)
Длина волны (Å) 1.00
Число атомов 1360
Статистика уточнений
Разрешение (Å) 301.0-2.9 (3.0-2.9)
I/σ(I) is 1.46, полнота 100%
Число рефлексов 1639309
Число атомов 404714
Rfree 2.00%
Rfree/Rwork (%) 22.8/18.2

Для решения структуры дрожжевой рибосомы был использован метод молекулярного замещения с использованием моделей 30S и 50S субчастиц *T. thermophilus* и *H. marismortui*. Такой подход позволил определить первичное местоположение молекулы осмия III, из которого был рассчитан начальный набор фаз с последующим уточнением. Первая структура рибосомы дрожжей была решена с разрешением 4.15 Å (108). На втором этапе модель была улучшена до 3Å разрешения (112). Фрагменты карт электронной плотности оснований рРНК и боковых цепей белка представлены на рисунок 23.

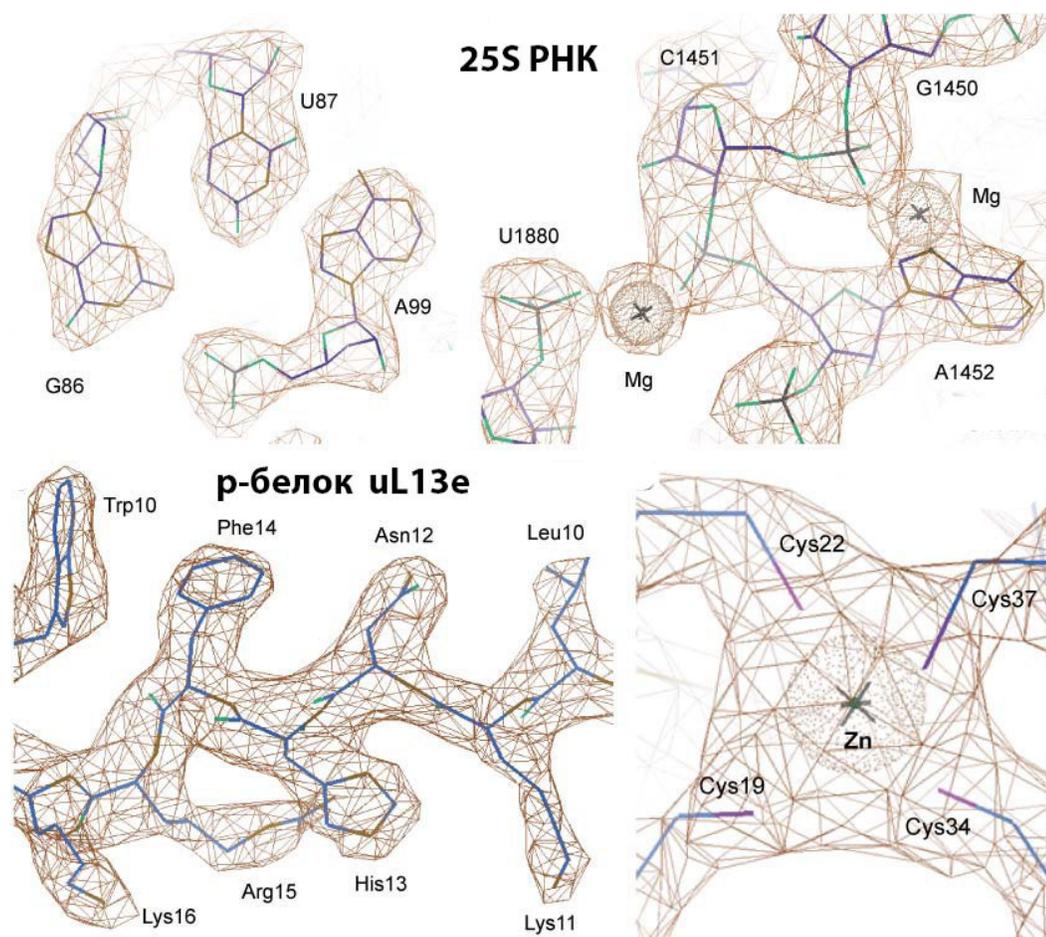


Рис. 23. Примеры карт электронной плотности при 3Å разрешения. Показаны нуклеотиды 25S РНК и взаимодействие ионов магния с фосфатами и основаниями. Показаны аминокислотные остатки белка uL13e, плотность для боковых цепей хорошо видна. Показан цинк связующий карман белка uL13e.

3.3. Интерпретация электронной плотности

Модель 70S рибосомы *T.thermophilus* содержащей тРНК и мРНК была использована для первичной суперпозиции и построения модели 80S рибосомы дрожжей (19). Была проведена подгонка модели в крио-ЭМ-карты с целью сравнения. Для построения рибосомных эукариотических специфических белков были использованы программы поиска структурных

гомологов. Было проделано несколько раундов построения моделей, уточнения и улучшения карт, что значительно улучшило качество электронной плотности (Рис. 24). Окончательная модель содержит ~13 000 рибосомных белковых аминокислот, что составляет ~90,5% р-белков, ~5500 нуклеотидов, что составляет ~95,5% рРНК и около 2000 ионов металлов. Обе рибосомы в составе асимметричной ячейки моделировали независимо друг от друга. Координаты рибосомных моделей доступны онлайн (PDB идентификаторы: 3U5B-E для первого мономера и 3U5F-I для второго).

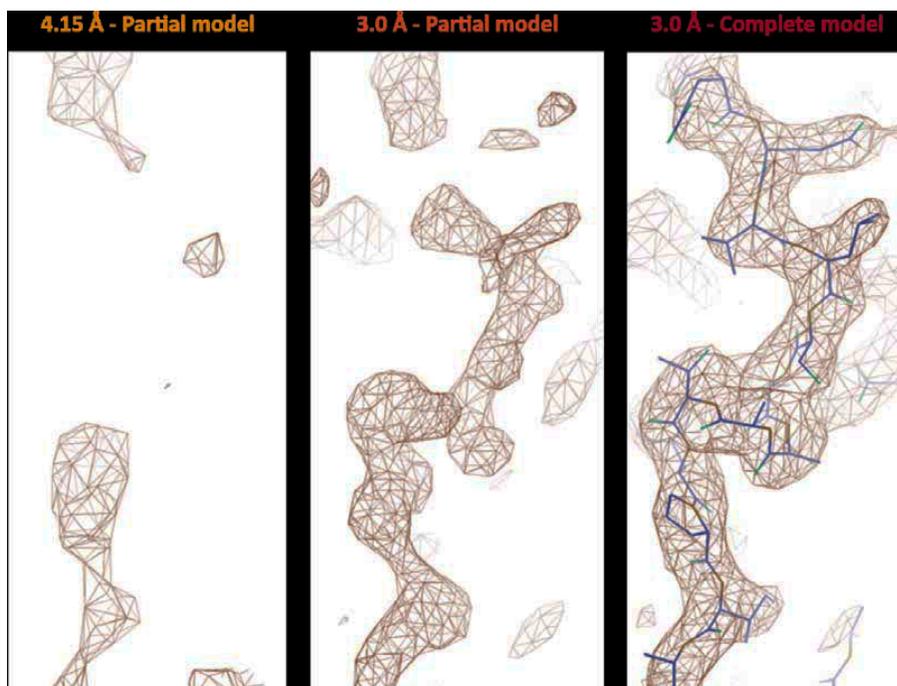
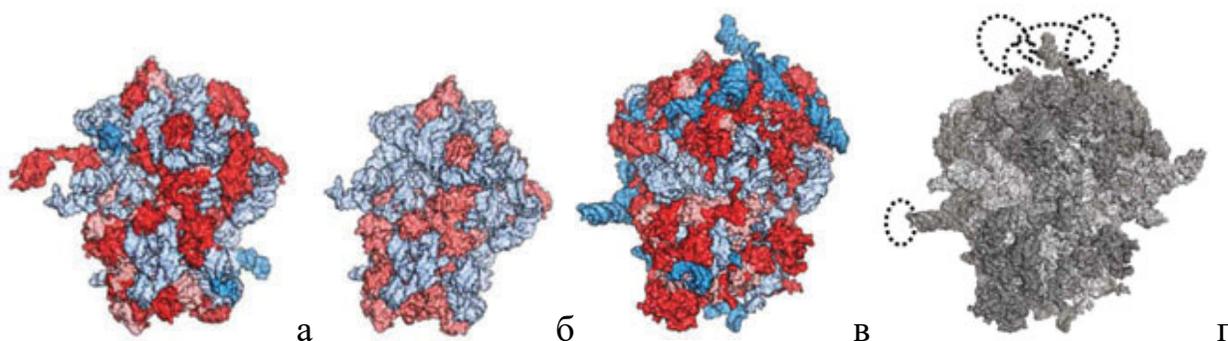


Рис. 24. Эволюция качества электронной плотности. Этот пример иллюстрирует эффекты разрешения и качества данных по электронной плотности. Плотность принадлежит белку L13e изначально отсутствует в модели среднего разрешения. Лучшее разрешение улучшает плотность (середина), которая становится ясной после нескольких раундов моделирования и уточнения (справа).

3.4. Модель рибосомы эукариот

3.4.1. Консервативное ядро рибосомы

Как бактериальные 70S (Рис. 25 а), так и дрожжевые 80S (Рис. 25 в), рибосомы являются асимметричными макромолекулярными комплексами, содержащими более 50 (для бактерий) и 80 (для дрожжей) различных белков и три или четыре РНК. Каждый рибосомный компонент представлен в рибосоме одной копией, за исключением белков стебля L7/L12 или P1/P2, которые присутствуют в четырех или шести экземплярах. Ранние генетические данные, подтвержденные структурными исследованиями, предполагали что бактериальные и эукариотические рибосомы имеют общее структурное «ядро» (Рис. 25б), которое состоит из 34 консервированных белков (15 в малой субчастице и 19 в большой субчастице) и ~4400 РНК-оснований, которые содержат основные функциональные центры рибосомы, такие как декодирующий участок, пептидилтрансферазный центр, а также тРНК и мРНК связывающие участки (25, 116, 117).



ПРОКАРИОТЫ	КОНСЕРВАТИВНОЕ ЯДРО РИБОСОМЫ	ДРОЖЖИ	ЧЕЛОВЕК
2.3 MDa	2.0 MDa	3.3 MDa	4.3 MDa
54 белка	34 белка	79 белков	80 белков
3 рРНК	3 рРНК	4 рРНК	4 рРНК
молекулы	молекулы	молекулы	молекулы
Большая субчастица:	Большая субчастица:	Большая субчастица:	Большая субчастица:
50S		60S	60S
33 белка (+14)	19 белков	46 белков (+26)	47 белков (++1)
23S рРНК:	23S рРНК:	25S рРНК:	28S рРНК:
2,904 оснований	2,843 оснований	3,396	5,034
5S рРНК: 121	5S рРНК: 121	оснований	оснований
оснований	оснований	5S рРНК: 121	5S рРНК: 121
		оснований	оснований
		5.8SpРНК:158	5.8SpРНК:156
		оснований	оснований
Малая субчастица:	Малая субчастица	Малая субчастица:	Малая субчастица:
30S		40S	40S
21 белок (+6)	15 белков	33 белка(+18)	33 белка(+19)
16SpРНК:1,542	16S: 1,458 оснований	18S: 1,800	18S: 1,870
снований		снований	снований

Рис. 25. Состав бактериальных (а) и эукариотических рибосом (в) и общее «ядро» (б). Бактериальные и эукариотические рибосомы разделяют массивное консервативное ядро, состоящее из РНК (светло-голубой) и белков (светло-красный). Рибосомы прокариот и эукариот содержат свой дополнительный к ядру набор белков. Дополнительные белки выделены на рисунке (ярко красный цвет) и дополнительные последовательности в рибосомальной РНК (синий цвет). Как 5.8 S, так и 25–28S молекулы рРНК являются гомологичными 23S рРНК у бактерий. Структура рибосомы высших эукариот, таких как рибосома человека, не была определена методом рентгено-структурного анализа, аналогично решенным структурам дрожжей и рибосом бактерий. Структура рибосомы человека представлена сером цвете (г), а пунктирные линии указывают на положение дополнительных последовательностей рРНК, которые обычно неупорядочены и не видимы в рентгеновских структурах и в ЭМ структурах. Структура рибосомы человека была определена методом крио-электронной микроскопии без дополнительных последовательностей рРНК, остальные структуры определены методом рентгено-структурного анализа (75, 76, 82, 112, 118-120).

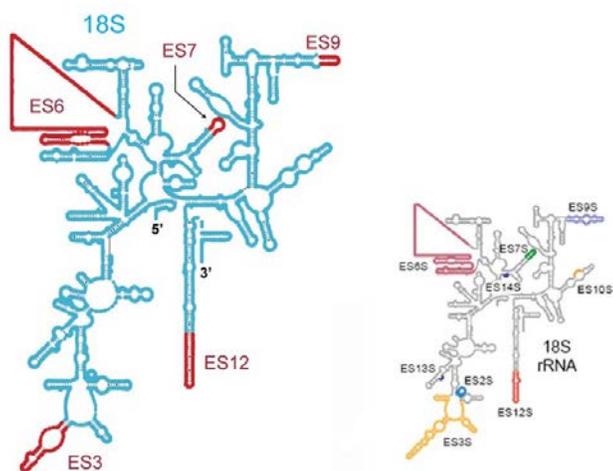
Дополнительно к основному «ядру» (Рис. 25), 70S рибосома содержит 20 бактерия-специфических белков (6 в 30S субчастице и 14 в 50S субчастице); несколько удлинений в консервативных белках, таких как белки S2, S3 и S4; и несколько удлинений рРНК, таких как спирали h6, h17 и h33a в 16S рРНК и спирали H1 и H68 в 23S рРНК.

80S рибосома содержит 46 эукариот-специфических белков (18 в 40S субчастице и 28 в 60S субчастице). Если сравнивать бактериальную рибосому и рибосому дрожжей, то количество белков увеличивается с 54 до 79, а длина рРНК увеличивается почти на 1000 нуклеотидов. Если сравнивать рибосому

дрожжей и рибосому высших эукариот и человека, то количество белков увеличивается на один белок с 79 до 80, а длина рРНК увеличивается еще почти на 2000 нуклеотидов. Таким образом, молекулярный вес рибосомы высших эукариот и бактерий различается почти в два раза 2.3 МДа и 4.3 МДа.

3.4.2. Дополнительные сегменты рибосомных РНК

Состав рибосом также может варьировать внутри бактерий, внутри эукариот, и внутри одного вида в разных условиях роста и стресса. У эукариот, размер рибосомы колеблется в пределах ~ 1 МДа, главным образом из-за вставок в четырех удлинненных сегментах ES7L, ES15L, ES27L и ES39L в 25S рРНК и сегментах ES3S и ES6S в 18S рРНК (Рис. 26). В нескольких случаях, рибосомы содержат на один белок меньше или на один белок больше.



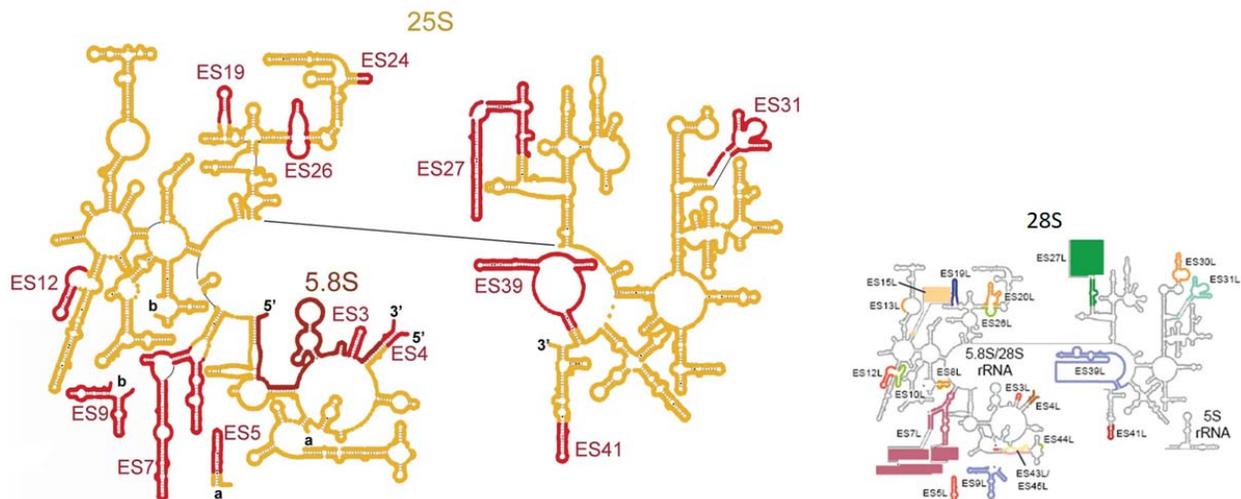


Рис. 26. Вторичная структура 18S рРНК дрожжей (голубой цвет) и 25S рРНК дрожжей (желтый цвет). Для сравнения даны уменьшенного размера вторичные структуры 18S рРНК и 28S рРНК рибосом человека. Удлиненные сегменты (ES) дрожжевых рРНК показаны красным цветом. Неструктурированные удлиненные сегменты рРНК человека закрашены красным и зеленым цветом.

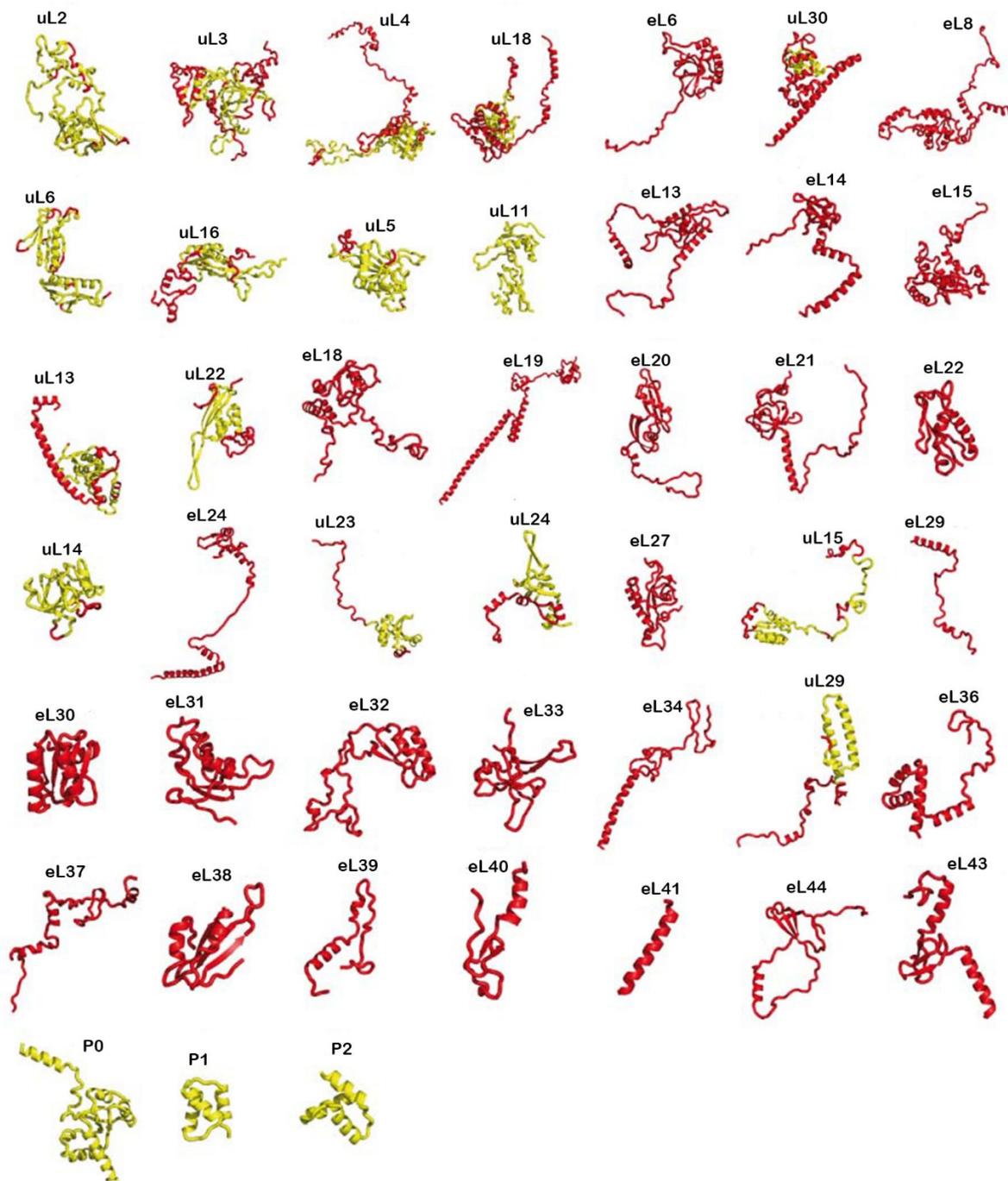
3.4.3. Дополнительные рибосомные белки

Модель дрожжевой рибосомы включает в себя 79 индивидуальных рибосомных белков (Рис. 27). Из них 46 белков 60S субчастицы и 33 белка 40S субчастицы. Многие рибосомные белки имеют необычные складки и содержат удивительно длинные хвосты и петли, идущие от глобулярных доменов. Большинство из них не погружены в глубь РНК ядра рибосомы, как в случае бактериальной рибосомы, а расположены на поверхности, где они в основном связаны с другими специфичными фрагментами для эукариот. Считается, что на ранних стадиях биогенеза рибосом рибосомные белки используют глобулярные домены для распознавания специфических областей рРНК, тогда как их белковые хвосты и петли способствуют сворачиванию

pРНК путем нейтрализации отрицательного заряда фосфатов РНК (121, 122). С определением кристаллической структуры эукариотической рибосомы стало ясно, что эти необычные белковые складки еще более распространены у эукариот (например, расширения белков uL4, uL22, uL23, uL29 и uS3 эукариот в сравнении с их бактериальными эквивалентами) (Рис. 27). Большинство из этих вставок и расширений взаимодействуют с другими специфичными для эукариот белками и сегментами расширения pРНК (например, uL4 с ES7L и ES15L и uL22 с ES39L), предполагая, что расширения белков могут способствовать сборке специфичных для эукариот компонентов рибосом во время биогенеза.

3.4.4. Анализ структуры рибосомы эукариот.

Рибосомные 30S и 40S субчастицы имеют схожие очертания, в том числе и ориентиры, известные как «голова», «тело», «платформа», (Рис. 28). Функциональные участки: мРНК и тРНК связывающие участки (А, Р и Е) расположены на внутренней поверхности субчастицы. мРНК поступает через туннель, расположенный между головой и плечом (между белками uS3, uS5) и проходит вокруг шеи внутренней поверхности субчастицы. Место выхода мРНК (5'-конец мРНК) находится между головкой и платформой (между белками uS7, uS11) (24, 82, 123). Декодирующий центр h 44 находится на внутренней поверхности малой субчастицы рядом с белком uS12 и белком eS30 (Рис. 28).



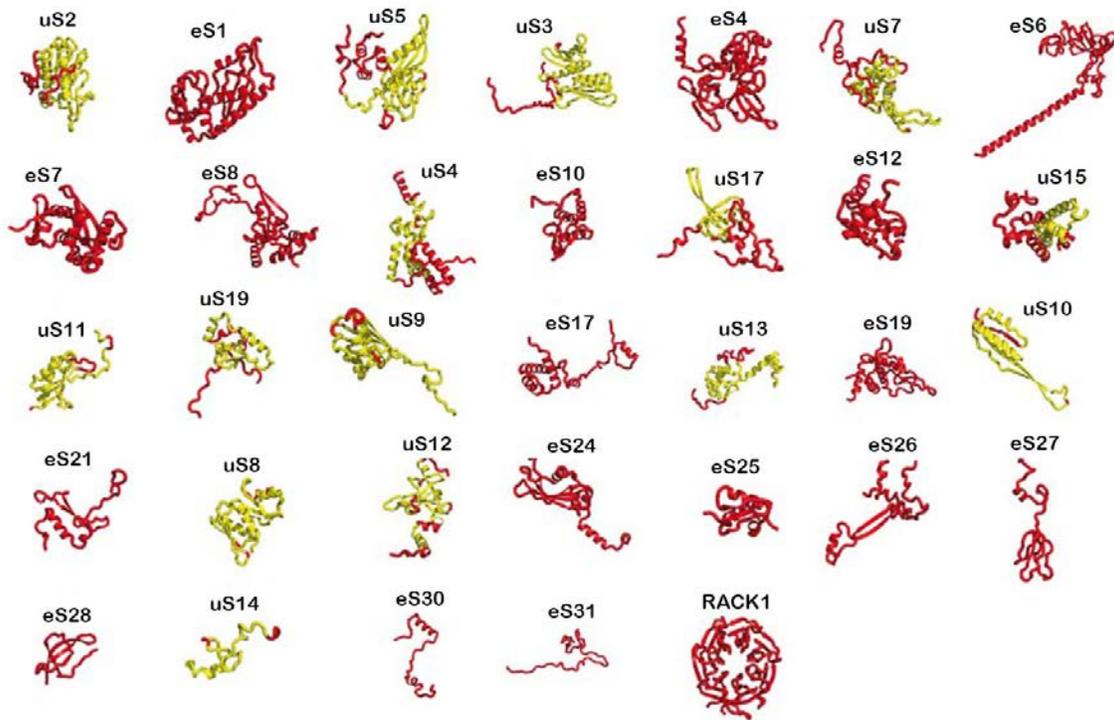


Рис. 27. Строение и консервативность всех рибосомных белков *S. Cerevisiae*, исключение составляет uL1. Домены (окрашены в желтый цвет), которые являются общими для дрожжей и бактерий, как определено структурным выравниванием между белковыми гомологами из *S. cerevisiae* и *E. coli*. Белки и дополнительные структурные элементы, которые не встречаются в бактериях, изображены красным цветом.

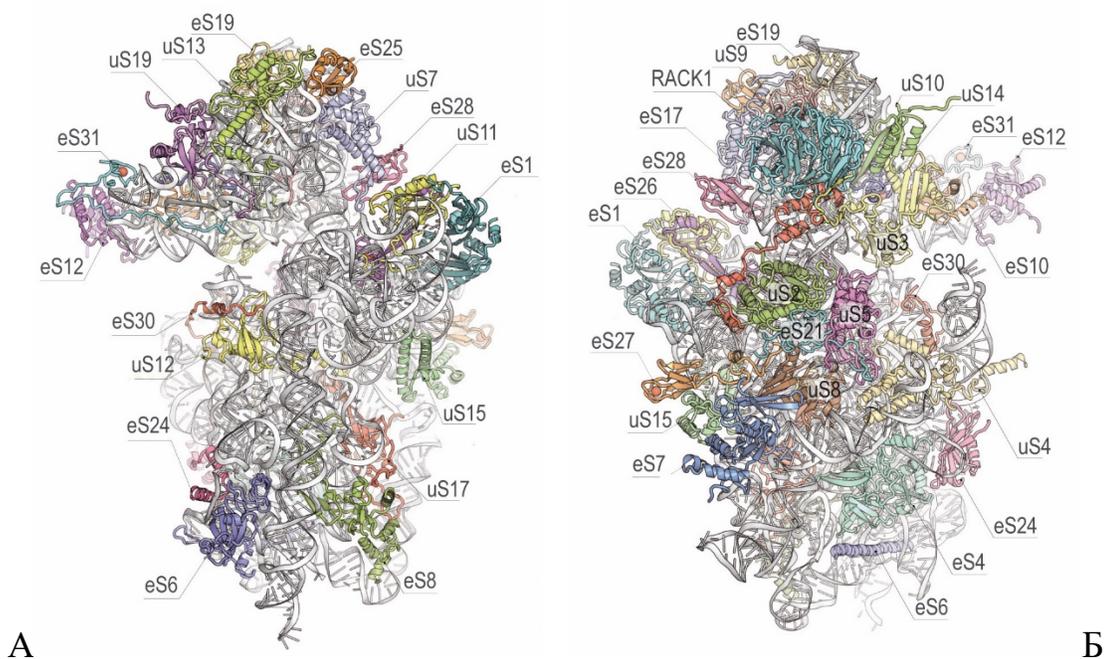


Рис. 28. Структура 40S субчастицы. (А) внутренняя поверхность субчастицы. (Б) поверхность субчастицы, обращенная к раствору.

Рибосомные 50S и 60S субъединицы имеют аналогичные короноподобные формы, которые имеют «центральную выпуклость», стебель L1 и L7/L12 стебель (у прокариот) или стебель Р (у эукариот) (Рис. 29). Большая рибосомная субчастица имеет 27 белков специфичных для эукариот и множество вставок и удлинений консервативных белков, и несколько удлинений рРНК, образуя почти непрерывный кольцеобразный узел, который огибает ядро.

На внутренней стороне большой субчастицы находятся три тРНК связывающих участка (А, Р и Е) и пептидилтрансферазный центр, где происходит образование пептидной связи. Этот пептидилтрансферазный центр находится рядом со входом в тоннель, по которому зарождающиеся

белки продвигаются через тело субчастицы на выход на сторону обращенную к раствору.

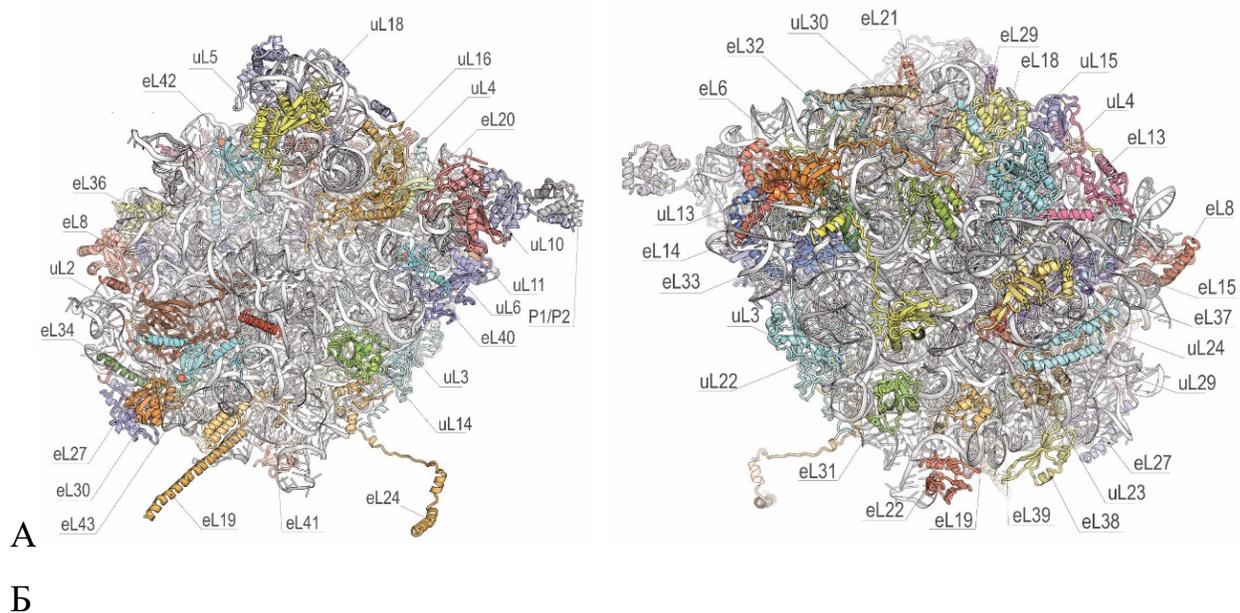


Рис. 29. Структура 60S субчастицы. (А) внутренняя поверхность субчастицы. (Б) поверхность субчастицы, обращенная к раствору.

3.4.5. Консервативность функциональных участков.

Отсутствие специфичных доменов рРНК и белков для бактерий или для эукариот в центральной части внутренней поверхности обеих субчастиц согласуется с универсальной консервативностью рибосомных функциональных участков, которые находятся в этой области рибосомы. Структура декодирующего участка, пептидилтрансферазного центра, область вокруг пептидного туннеля на стороне раствора, которая используется для ассоциации рибосом с мембранами во время синтеза белка, также лишена специфических фрагментов (Рис. 30).

Высокая консервативность последовательностей и структур участка декодирования, пептидилтрансферазного центра, так же участков связывания тРНК и мРНК, предполагают идентичность механизмов декодирования генетической информации (95, 123) и образования пептидной связи, предложенный в результате исследований рибосомы прокариот и архея могут быть применены к эукариотическим рибосомам (93). Кроме того, мы можем предположить, что эукариотспецифические элементы, участвуют в регуляции инициации и терминации синтеза белка в клетке эукариот (124-126).

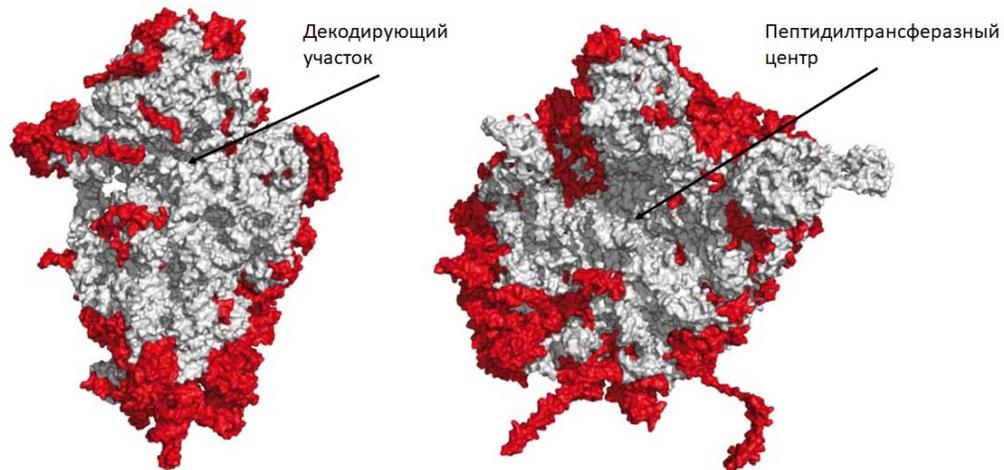


Рис. 30. Отсутствие эукариотических специфических элементов (красный цвет) на границе раздела обеих субъединиц. Консервативные элементы рибосомы (серый цвет).

3.4.6. Межсубчастичные мосты рибосомы.

Рибосомные субчастицы ассоциируют в полную рибосому, образуя несколько межсубчастичных мостов. Важность этих мостов очевидна, потому

что они поддерживают взаимосвязь между малой и большой субчастицами при работе рибосомы. Во время синтеза белка рибосома претерпевает глобальные конформационные перестройки, которые необходимы для транслокации мРНК и тРНК. Эти изменения связаны с межсубчастичным вращением и поворотом головного домена малой субчастицы.

Несколько специфичных для эукариот межсубчастичных мостов были описаны по результатам анализа низкого разрешения крио-ЭМ исследований рибосомы дрожжей (127). Наша модель дала более точный и детальный обзор молекулярных компонентов, участвующих в этих контактах между субчастицами рибосом. В рибосомном ядре имеется семь мостов между субчастицами. Дополнительно к ним есть несколько бактерия - и эукариотспецифических мостов. В отличие от бактерий, в формировании эукариот-специфичных мостов белки играют доминирующую роль. Специфичные для эукариот мосты расположены на периферии границы раздела субъединиц и со стороны растворителя обеих субъединиц (Рис.31).

Существует только один специфичный для эукариот мост, расположенный в центре рибосомы мостик eV14. Мост образуется самым маленьким белком в дрожжевых клетках (25 аминокислот) белок eL41, который состоит из одной альфа-спирали. eL41 выступает из большой в малую субчастицу около декодирующего участка.

У бактерий есть только один пример такого необычного моста, то есть образованного рибосомным белком большой субчастицы и связанного с малой субчастицей. Этот необычный мостик образован белком bL31, который соединяет центральную выпуклость большой субчастицы с лабильным головным доменом малой субчастицы.

Отличительной особенностью эукариотической большой субчастицы является наличие двух длинных белковых спиралей, идущие слева и справа субчастицы. Эти спирали, которые являются специфичными для эукариот удлиннениями белков eL19 и eL24 (Рис. 23), создают мосты eB12 и eB13. Белок eL24 состоит из N-терминального домена, который находится на большой субчастице, далее идет длинный гибкий хвост, который выступает далеко в сторону тела малой субчастицы и достигает задней части субчастицы. Эта структура eL24 является ключевым игроком в повторной инициации при считывании полицистронных мРНК (128).

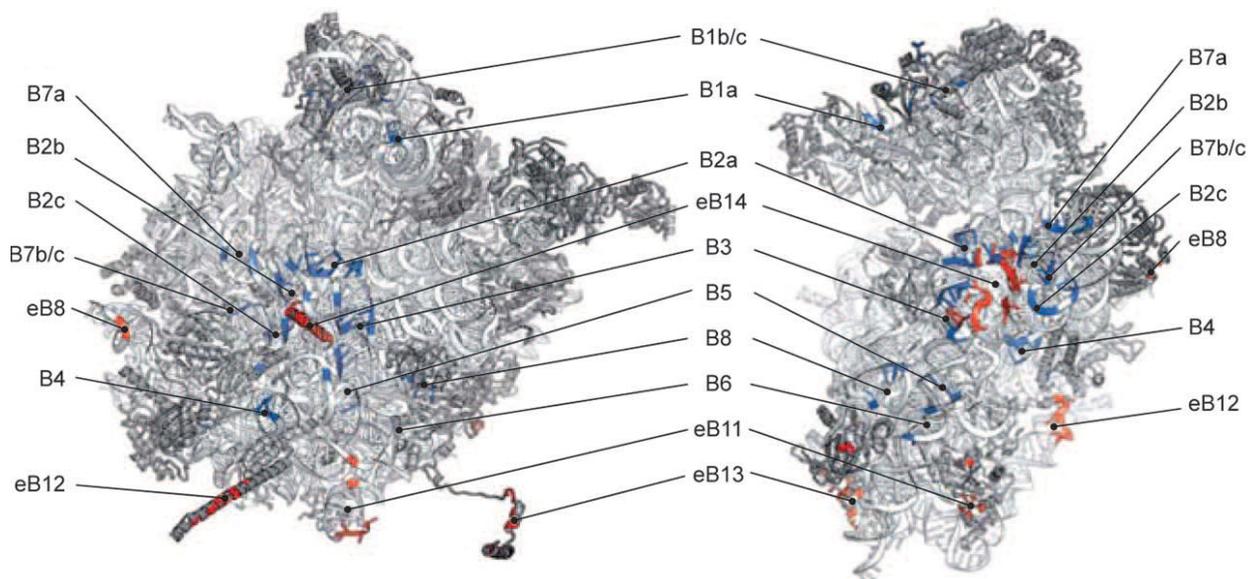


Рис. 31. Контактные внутренние поверхности субчастиц и межсубчастичные мосты специфические для эукариот обозначены, как eB. Белок eL19, участвует в формировании моста eB12. Белок eL24 простирается от большой субчастицы для взаимодействия с белком eS6 на малой субчастице, формируя мост eB13. Белок eL41 формирует мост eB14.

3.4.7. Нерибосомный белок Stm1.

Анализ структуры дрожжевой рибосомы выявил один дополнительный нерибосомный белок, который был идентифицирован, как белок Stm1. Известно, что белок Stm1 может быть ассоциирован с рибосомами и может ингибировать синтез белка, но природа и роль этих взаимодействий была неизвестна (129, 130). Наша структура показала, что Stm1 связывается с головным доменом 40S субчастицы и исключает связывание мРНК (Рис. 32). Кроме того, Stm1 следует по пути мРНК через тРНК связывающие участки А и Р. Далее белок переходит в область центрального выступа 60S субчастицы, взаимодействуя со спиралью H84 и далее с 5S рРНК и белком uL5 (рис. 32). Вдоль всей длины белок Stm1 контактирует с девятью различными рибосомными белками, с одним на 60S субчастице и с восемью на 40S субчастице. Располагаясь на рибосоме таким образом белок Stm1 сжимает две субъединицы, предотвращает их диссоциацию. Было показано, что Stm1 играет важную роль в восстановлении дрожжей после длительных периодов дефицита питательных веществ. Поэтому мы смогли получать монорибосомы выращивая дрожжи в течение нескольких минут в условиях глюкозного голодания (108). Таким образом, этот белок является функциональным аналогом некоторых белков стресса прокариотических рибосом (131, 132).

3.4.8. Новая номенклатура рибосомных белков (Таблица 1 и 2)

В основе создания новой номенклатуры дрожжевых рибосомных белков лежит утверждение, что гомологичным макромолекулам, выполняющим одни и те же функции в разных организмах, должно быть присвоено одно и то же название. Гомологичные макромолекулы - это продукты генов, которые произошли от общего предка. Тот факт, что две макромолекулы гомологичны, часто можно установить просто путем сравнения их последовательностей, но

иногда это становится очевидным только после того, как их трехмерные структуры были определены, так что сравнение может быть сделано с использованием первоначального выравнивания третичных, а не первичных структур белков.

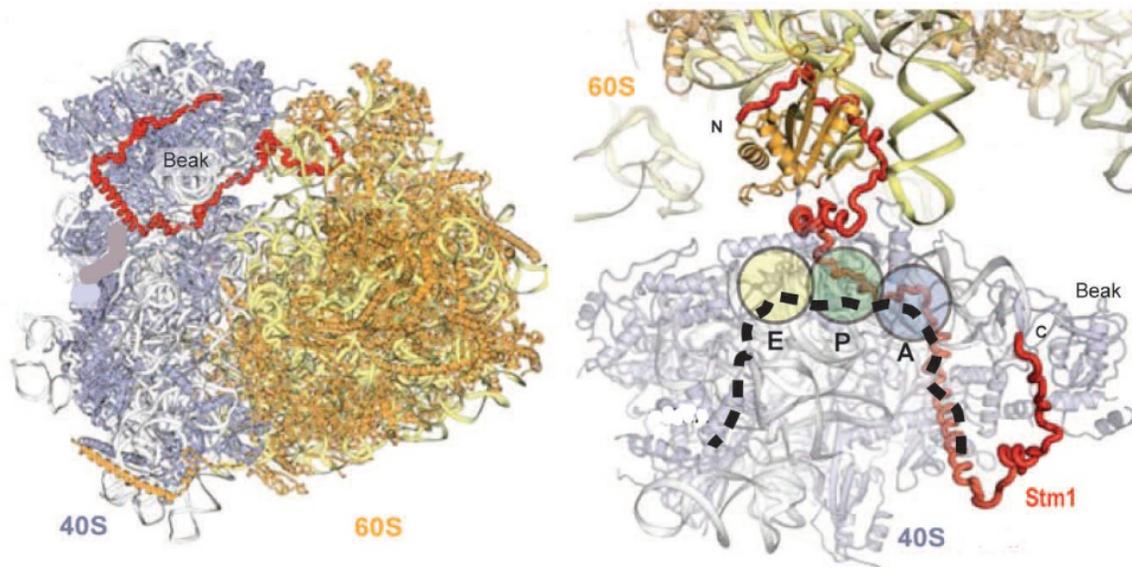


Рис. 32. Нерибосомный белок Stm1 взаимодействует с обеими субъединицами и предотвращает связывание мРНК. Рисунок слева: Белок Stm1 (красный) связывается с 40S (синий) и 60S (желтый) рибосомными субчастицами. Рисунок справа: Вид сверху на «головной» домен малой субчастицы и «центральный выступ» большой субчастицы. Пунктирная черная линия представляет собой траекторию движения мРНК по данным к кристаллическим структурам бактериальных рибосом. Окружностями указаны участки А, Р и Е тРНК.

Уже давно появилась задача разработать единую систему наименования рибосомальных белков, которая бы удовлетворяла этому принципу. Причина заключается в том, что характеристика рибосомных белков началась в 1960-х

годах, в то время, когда не было никаких структур и единственным способом получения белковых последовательностей было их прямое секвенирование. К тому времени, когда было получено достаточно последовательностей, чтобы начать идентификацию гомологий, в литературе появилось несколько различных номенклатур рибосомных белков.

Наша новая система наименования рибосомальных белков представлена в таблицах 1 и 2. Поскольку рибосомные белки из *E. coli* были первыми выделены и полностью секвенированы и описаны в обширной литературе, то их архейным и эукариотическим гомологам присвоены наименования белков из рибосом *E. coli*. Белкам, обнаруженным в рибосомах из всех трех главных филогенетических доменов (бактерии, архея и эукариоты) присваивается буква “u” (универсальный), который следует перед их названиями *E. coli*. Бактериальные белки без эукариотических (или архея) гомологов обозначаются префиксом “b” (бактериальный). Точно так же рибосомальные белки из архея, лишенные гомологов как в эубактериальных рибосомах, так и в эукариотических рибосомах, должны быть идентифицированы с помощью префикса “a” (архея), но до сих пор ни один из них не был найден. Те эукариотические рибосомные белки, которые не имеют эубактериального гомолога, получили букву “e” (эукариот).

3.5. Выводы из анализа структуры рибосом прокариот и эукариот

Опубликованные в 2000-2006 годах структуры высокого разрешения сначала бактериальных рибосомальных субъединиц и позднее полной бактериальной рибосомы, содержащей мРНК и три тРНК произвели революцию в области изучающей механизмы и функции рибосомного биосинтеза белков в клетке. Они обеспечили понимание функциональных

комплексов рибосомы полученных с помощью кристаллографии и электронной микроскопии.

Решение структуры полной эукариотической рибосомы на высоком разрешении в 2011 позволило идентифицировать около 200 000 атомов (без учета водорода) структуры рибосомы.

На сегодняшний день знание атомарной структуры рибосомы, изученной в различных состояниях во время ее функционирования, облегчило интерпретацию сложных биохимических и генетических экспериментов.

Сравнение двух рибосомных структур, прокариотической рибосомы и эукариотической рибосомы, показало существование консервативной организации основных функциональных участков, ответственных за процесс элонгации трансляции. В тоже время увеличение размера эукариотической рибосомы за счет дополнительных рибосомных белков и удлинения рибосомной РНК может объяснить значительно более сложные процессы инициации трансляции, терминации и рециркуляции. По всей видимости дополнительные элементы рибосомы вовлечены в механизмы регуляции синтеза белка.

Оставался необъясненным вопрос, как малые молекулы – ингибиторы (антибиотики), которые связываются с консервативными участками рибосом, могут дискриминировать прокариотическую рибосому от эукариотической рибосомы.

Таблица 1 и 2

Малая субчастица		Bacteria	Yeast	Human
-	B	S1	-	-
eS1	A E	-	S1	S3A
uS2	B A E	S2	S0	SA
uS3	B A E	S3	S3	S3
uS4	B A E	S4	S9	S9
eS4	A E	-	S4	S4
uS5	B A E	S5	S2	S2
-	B	S6	-	-
eS6	A E	-	S6	S6
uS7	B A E	S7	S5	S5
eS7	E	-	S7	S7
uS8	B A E	S8	S22	S15A
eS8	A E	-	S8	S8
uS9	B A E	S9	S16	S16
uS10	B A E	S10	S20	S20
eS10	E	-	S10	S10
uS11	B A E	S11	S14	S14
uS12	B A E	S12	S23	S23
eS12	E	-	S12	S12
uS13	B A E	S13	S18	S18
uS14	B A E	S14	S29	S29
uS15	B A E	S15	S13	S13
-	B	S16	-	-
uS17	B A E	S17	S11	S11
eS17	A E	-	S17	S17
-	B	S18	-	-
uS19	B A E	S19	S15	S15
eS19	A E	-	S19	S19
-	B	S20	-	-
-	B	S21	-	-
-	B	THX	-	-
eS21	E	-	S21	S21
eS24	A E	-	S24	S24
eS25	A E	-	S25	S25
eS26	E	-	S26	S26
eS27	A E	-	S27	S27
eS28	A E	-	S28	S28
eS30	A E	-	S30	S30
eS31	A E	-	S31	S27A
RACK1	E	-	Asc1	RACK1
Большая субчастица				
uL1	B A E	L1	L1	L10A
uL2	B A E	L2	L2	L2
uL3	B A E	L3	L3	L3
uL4	B A E	L4	L4	L4
uL5	B A E	L5	L11	L11
uL6	B A E	L6	L9	L9
eL6	E	-	L6	L6
eL8	A E	-	L8	L7A
-	B	L9	-	-
uL11	B A E	L11	L12	L12
uL13	B A E	L13	L16	L13A
eL13	A E	-	L13	L13
uL14	B A E	L14	L23	L23
eL14	A E	-	L14	L14
uL15	B A E	L15	L28	L27A
eL15	A E	-	L15	L15
uL16	B A E	L16	L10	L10
-	B	L17	-	-
uL18	B A E	L18	L5	L5
eL18	A E	-	L18	L18

-	B	L19	-	-
eL19	A E	-	L19	L19
-	B	L20	-	-
eL20	E	-	L20	L18A
-	B	L21	-	-
eL21	A E	-	L21	L21
uL21	B A E	L22	L17	L17
eL22	E	-	L22	L22
uL23	B A E	L23	L25	L23A
uL24	B A E	L24	L26	L26
eL24	A E	-	L24	L24
-	B	L25	-	-
-	B	L27	-	-
eL27	E	-	L27	L27
-	B	L28	-	-
eL28	E	-	-	L28
uL29	B A E	L29	L35	L35
eL29	E	-	L29	L29
uL30	B A E	L30	L7	L7
eL30	A E	-	L30	L30
-	B	L31	-	-
eL31	A E	-	L31	L31
-	B	L32	-	-
eL32	A E	-	L32	L32
-	B	L33	-	-
eL33	A E	-	L33	L35A
-	B	L34	-	-
eL34	A E	-	L34	L34
-	B	L35	-	-
-	B	L36	-	-
eL36	E	-	L36	L36
eL37	A E	-	L37	L37
eL38	A E	-	L38	L38
eL39	A E	-	L39	L39
eL40	A E	-	L40	L40
eL41	A E	-	L41	L41
eL43	A E	-	L43	L37A
eL44	A E	-	L42	L36A
P1/P2	B A E	L7/L12	P1/P2 ($\alpha\beta$)	LP1/LP2
P0	B A E	L10	P0	LP0

*B – bacteria, A – archaea, E – eukaryotes

3.6. Структурные исследования ингибиторов рибосомы эукариот

Открытие и глобальное использование антибиотиков произвели революцию в поддержке здоровья инфекционных больных, заболевания которых вызваны патогенными бактериями. Рибосома является основной мишенью антибиотиков. Известно, что более пятидесяти процентов из них связывают и блокируют функцию бактериальной рибосомы. В области исследований и разработок антибиотиков, рентгено-структурный метод анализа структуры рибосом зарекомендовал себя как передовой метод исследования механизма действия антибиотиков и разработки новых терапевтических кандидатов, некоторые из которых уже находятся на рынке лекарственных средств (133).

Решением структуры эукариотической рибосомы с высоким разрешением в 2011 году методом рентгено-структурного анализа (112), кристаллография открыла новую область исследования ингибиторов трансляции и регуляторов эукариотических рибосом.

Исследования таких соединений представляют интерес по разным причинам. С одной стороны, анализ методом кристаллографии специфичных для эукариот ингибиторов позволяет выяснить механизм их действия. С другой стороны, позволяет исследовать правила видовой специфичности. Растет количество природных соединений выделенных из вторичных метаболитов, продуцируемых различными морскими организмами, растениями, почвенными и другими микроорганизмами, которые проявляют ингибирующий эффект особенно против эукариотических рибосом (134). Сравнение результатов этих исследований с бактериальными ингибиторами позволило определить структурные элементы рибосомы, ответственные за видовую специфичность.

Одна из целей таких исследований связана с разработкой новых подходов для понимания функции рибосомы. Как показывают многочисленные исследования с использованием бактериальных антибиотиков, ингибиторы рибосом представляют собой особо важные зонды для блокирования механизма трансляции на каждом этапе. Возможность селекции и анализа этих функциональных промежуточных звеньев имеют решающее значение для полного понимания процесса трансляции на атомарном уровне.

Специфичные для эукариот ингибиторы представляют особый интерес для разработки новых классов противоинфекционных препаратов для удовлетворения растущих медицинских потребностей в борьбе с патогенными для человека грибами и паразитами. В дополнение, предварительные результаты и клинические испытания таких ингибиторов показывают, что возможно использование их для противоопухолевого лечения и терапии, при некоторых генетических заболеваниях (134). Действительно некоторые молекулы могут выступать в качестве регуляторов эукариотической рибосомы для «проскальзывания» преждевременных стоп-кодонов, обнаруживаемых в генетических заболеваниях, восстанавливая синтез полноразмерного функционального белка (135).

3.6.1. Центры связывания рибосомных ингибиторов

Скрининг и выделение вторичных метаболитов из живых организмов проложили путь к открытиям множества лекарств. Многие из них оказались ингибиторами, специфичными только для эукариотической рибосомы. Первые эукариот-специфические ингибиторы были выделены из бактерий или морских губок. На основе их структурных детерминант можно выделить четыре различные подгруппы ингибиторов: глутаримиды (например,

циклогексимид и лактимидомицин), педерины (например, педерин, микаламид), мирипороны (например, мирипорон 3/4) и теданолиды (например, 13-дезокситеданолид) (136-139) (Рис. 33).

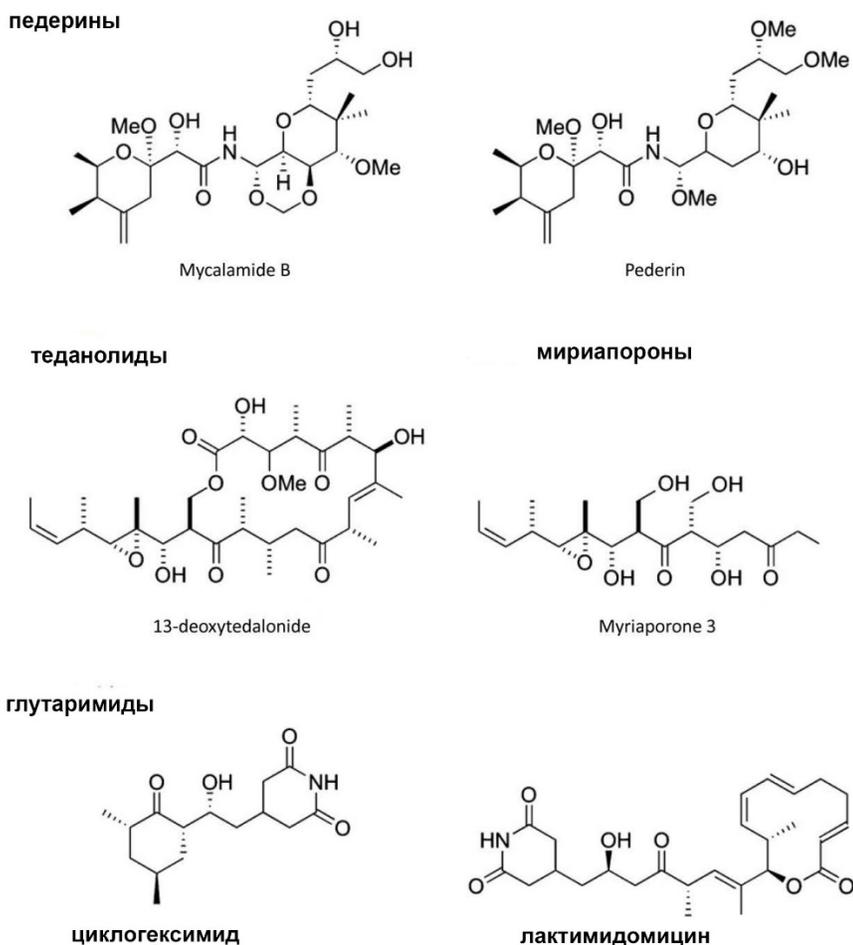


Рис. 33. Различные классы специфичных к эукариотам ингибиторов связывающихся в одном функциональном участке рибосомы. Были выделено четыре различных класса: педерины, теданолиды, мирипороны и глутаримиды.

Глутаримиды - это природные продукты, выделенные из бактерий *Streptomyces* и характеризующиеся наличием глутаримидного фрагмента. Этот класс малых молекул содержит более двадцати представителей, которые демонстрируют разнообразие структур и функций (140). Минимальная структура представлена циклогексимидом (Рис. 33). Устойчивость дрожжей к циклогексимиду была обнаружена в мутациях двух рибосомных белков eL44 и uL15, которые расположены в непосредственной близости от E-участка тРНК на 60S субчастице (141, 142). Такие мутации также вызывают резистентность к лактимидомицину, поэтому было предположено, что оба ингибитора имеют один и тот же участок связывания на рибосоме (134). Было показано, что нуклеотид C2764 25S рРНК (нумерация дрожжей) взаимодействует с циклогексимидом и лактимидомицином и взаимодействует с ССА концом E-тРНК. Оба ингибитора блокируют транслокацию тРНК, но интересно, что они используют различные способы действия. Ранние исследования показали, что циклогексимид блокирует рибосому, предотвращая высвобождение тРНК из E-участка (143). Позже с применением новых методов выяснилось, что циклогексимид останавливает рибосому в любом месте трансляции, а лактимидомицин блокирует только инициацию трансляции (144).

Сравнение структур рибосом прокариот, архия и эукариот показывает, что имеются существенные различия в структуре участков связывания тРНК. Такие различия могут объяснять эукариотическую специфичность ингибиторов E-участка. Педерин и теданолидные ингибиторы E-участка были исследованы методом кристаллографии на 50S субчастицах архия (145, 146). Оказалось, что оба ингибитора связываются рядом с ССА-концом тРНК. Группа Ненада Бана исследовала участок связывания циклогексимиды на 60S субчастицах *Tetrahymena thermophila*. К сожалению низкое качество

электронной плотности около 9Å препятствовали корректному моделированию циклогексемида (147).

Чтобы получить общее представление о механизмах действия ингибиторов эукариотической рибосомы и создать основу для разработки лекарственных препаратов, мы определили 16 кристаллических структур рибосомы *S.cerevisiae* в комплексах с 12 эукариот-специфичными и 4 ингибитора широкого спектра действия на высоком разрешении. Неспецифичные ингибиторы нацелены на пептидилтрансферазный центр на большой субчастице (бластицидин S), декодирующий центр (генетицин G418) и участок связывания мРНК-тРНК на малой субчастице (пактамицин, эдеин). В список эукариот-специфичных ингибиторов вошли циклогексимид, лактимидомицин, филлантозид, Токсин Т-2, дезоксиниваленол, веррукарин А, нарциклазин, ликорин, нагилактон С, анисомицин, гомогаррингтонин и криптоплейрин (Рис. 34). (148).

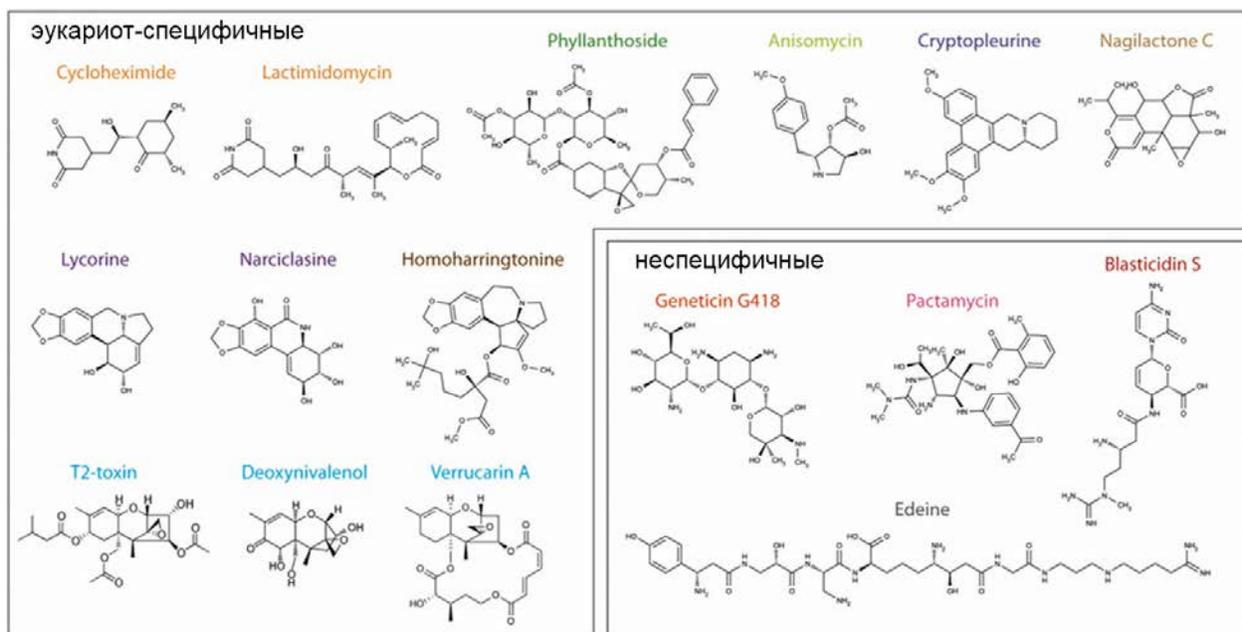


Рис. 34. Химические структуры 16 низкомолекулярных ингибиторов использованных в кристаллографических исследованиях (148). Циклогексимид и лактимидомицин широко используются в лабораторных исследованиях механизма трансляции (134, 149). Гомогаррингтонин доступен для лечения хронического миелолейкоза (150). Ликорин и нарциклазин являются алкалоидами, которые известны своими лечебными и токсичными свойствами (151). Токсин Т-2, дезоксиниваленол и веррукарин являются широко распространенными представителями микотоксинов (152). Аминогликозид генетицин (G418) способствует считыванию преждевременных стоп кодонов (135).

Наши исследования иллюстрируют химическое разнообразие малых молекул ингибиторов эукариотических рибосом. Все они были обнаружены в непосредственной близости от участков связывания мРНК и тРНК на большой и малой субчастицах (Рис. 35). В отличие от бактериальных антибиотиков, ни один из них не был расположен в пептидном туннеле, который коррелирует с увеличением числа рРНК модификаций в этой области эукариотической рибосомы (153). Хотя дрожжевая 80S рибосома содержит 1,4 МДа дополнительного веса, по сравнению с весом бактерий, примечательно, что все эукариот-специфические ингибиторы связываются с консервативными функциональными участками. Это наблюдение подчеркивает значительную роль одиночных нуклеотидных замен и возможно модификаций при формировании эукариот-специфичности.

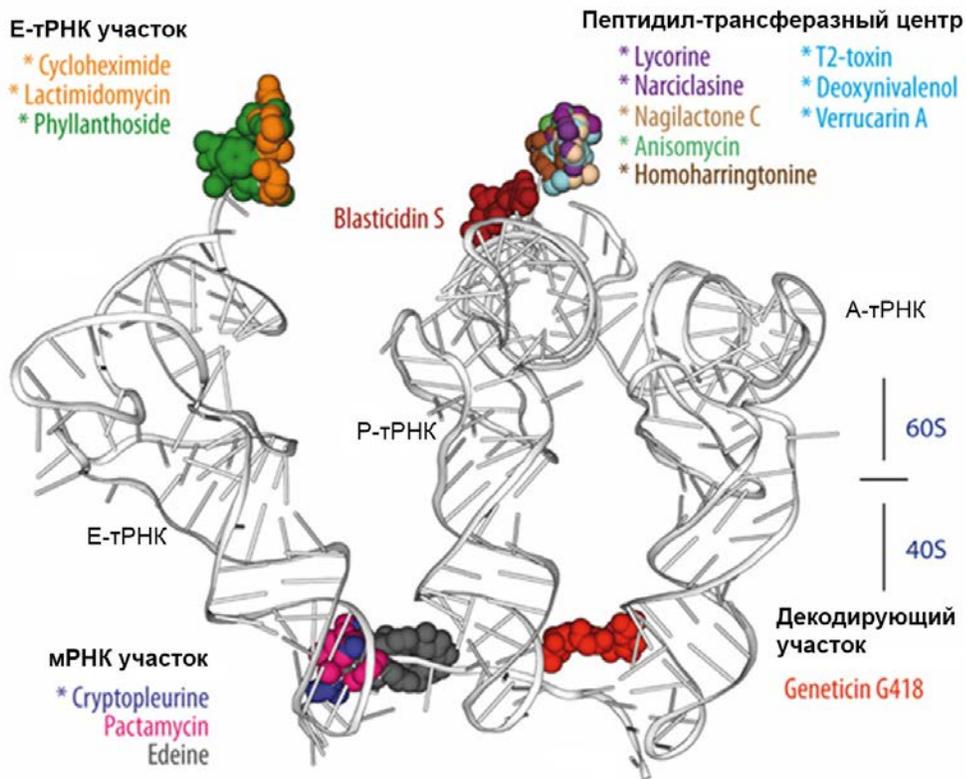
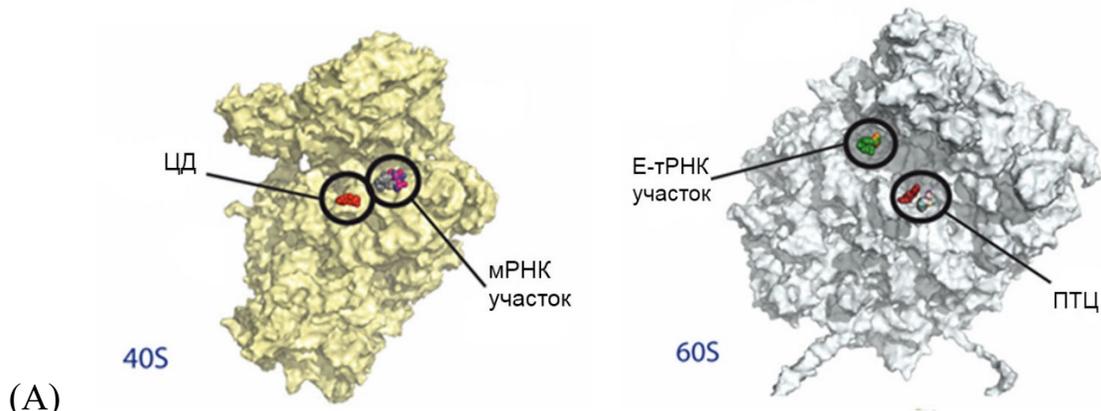


Рис. 35. (А) Участки связывания ингибиторов на рибосоме дрожжей. Участки связывания могут быть сгруппированы по четырем функциональным областям: участок связывания тРНК и пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) на большой субчастице (60S) и центр декодирования (ЦД) и канал для

связывания мРНК на малой субъединице (40S). (Б) Представлены все ингибиторы связанные с участками мРНК и тРНК на рибосоме. Структуры А, Р и Е тРНК изображены серым цветом. Эукариот-специфические ингибиторы отмечены звездочкой.

3.6.1.1. Е-тРНК связывающий участок.

Глутаримидные ингибиторы, циклогексимид и лактимидомицин, связываются в Е-участке большой субчастицы в кармане, образованном консервативными нуклеотидами 25S рРНК и эукариот-специфическим белком eL42 (Рис. 36А). Циклогексимид взаимодействует исключительно с тремя нуклеотидами рРНК (G92, C2764 и U2763) через пять прямых водородных связей. Кроме того, стэкинг взаимодействие наблюдается между одним атомом кислорода глутаримидной группы и ароматическим кольцом C2764. Нуклеотиды, которые координируют циклогексеимид, они же образуют участок связывания ССА-конца Е-тРНК (Рис. 36Б). Наложение структуры Е-тРНК и циклогексеимида показывает, что их участки связывания перекрываются (Рис.36Б). На самом деле, консервативный аденозин на 3' конце тРНК полностью накладывается на циклогексеимид.

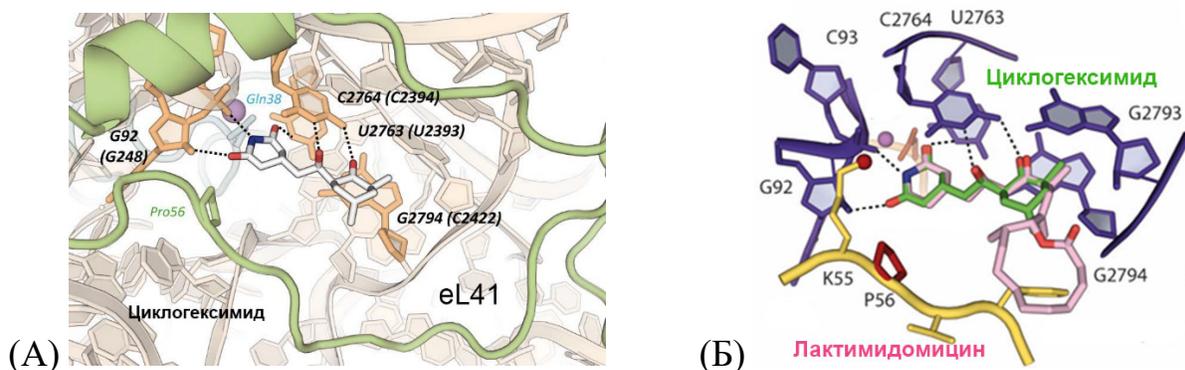


Рис. 36. (А) Циклогексимид (изображен белым цветом) связывается E-участком тРНК на большой субъединице. Циклогексеимид взаимодействует исключительно с тремя нуклеотидами рРНК (G92, C2764 и U2763) через пять прямых водородных связей. Фиолетовая сфера представляет собой молекулу растворителя стабилизированную Gln38, а также остатки G92 и U2763. Подписи в круглых скобках соответствуют нумерации рРНК E. coli. (Б) Лактимидомицин (изображен розовым цветом) сравнивается с циклогексимидом, который изображен зеленым цветом, несет дополнительное лактоновое кольцо, которое расположено поверх eL42 и направленный к внутренней поверхности субчастицы.

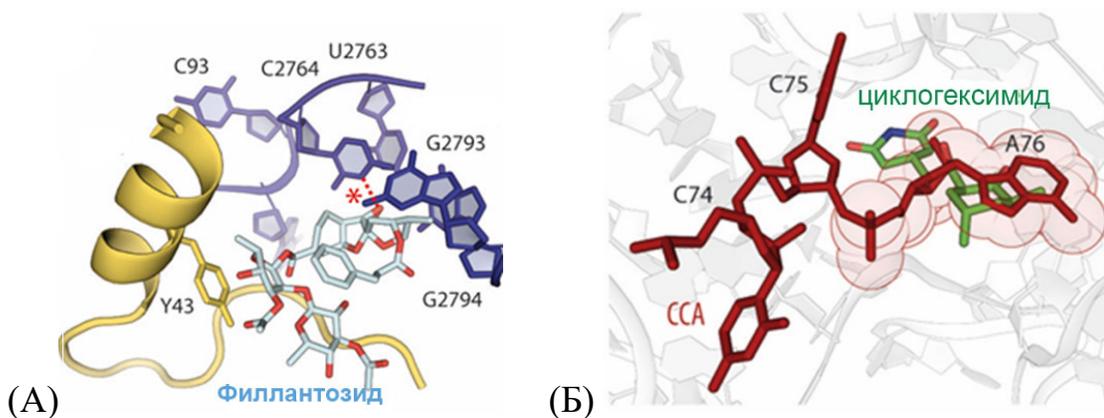


Рис. 37. Филлантозид (изображен голубым цветом), напоминает тРНК и контактирует с теми же нуклеотидами рРНК и белком eL42, как глутаримиды (Рис. 27). Циклогексимид (изображен зеленым цветом) занимает E-тРНК-связывающий участок рибосомы и перекрывается с ССА концом тРНК (изображен красным цветом).

Лактимидомицин несет дополнительное лактоновое кольцо, которое расположено поверх eL42 и направленный к внутренней поверхности субчастицы. Химически глутаримиды не похожи на филлантозид, напоминающий тРНК, который вступает в контакт с теми же нуклеотидами рРНК и взаимодействует с белком eL42 (Рис. 36Б).

Строгая селективность ингибиторов E-участка эукариот видимо объясняется наличием двух бактериально-специфичных нуклеотидов рРНК, которые препятствуют связыванию ингибиторов (Рис. 38). Для локализации положения тРНК на большой субчастице, мы решили структуру рибосомы дрожжей в комплексе с три-нуклеотидом ССА, который имитирует акцепторный конец деацелированной тРНК (Рис. 37Б). Эти структуры объясняют предыдущие биохимические данные, показывающие, что циклогексимид и лактимидомицин конкурируют со связыванием ССА-конца тРНК в E-участок большой субъединицы (134). Филлантозид, вероятно, имеет аналогичный механизм ингибирования (Рис. 37А) (154).

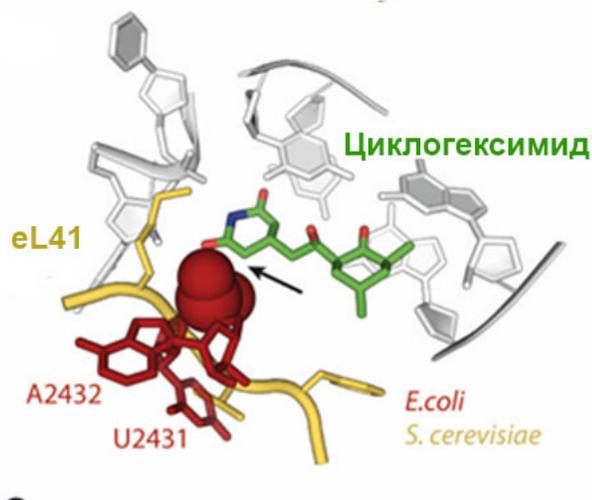


Рис. 38. Два специфичных для бактерий нуклеотида, U2431 и A2432, предотвращают связывание ингибиторов E участка с бактериальной рибосомой.

Рибосомный белок eL41, по-видимому, формирует общую полость, но не участвует непосредственно в связывании циклогексимида. Известно, что природные мутанты белка eL41 придают дрожжам устойчивость к циклогексимиду. Единственное изменение в eL41 в положении 56 (пролин на глутамин) резко меняет чувствительность к ингибитору (141). В хорошем согласии со структурой, боковой остаток глутамина в этом положении мешает связыванию циклогексимида. В дополнение к белку eL41, еще одна мутация устойчивости к циклогексимиду была выявлена в белке eL29, консервативном белке, расположенном в непосредственной близости к участку связывания ингибитора. Глутамин в положении 38 белка eL29 окружен несколькими молекулами растворителя, которые связываются с двумя нуклеотидами рРНК Е-участка (G92 и C2764). (155). Наличие отрицательного заряда в этой области, который образуется в результате мутации Q38E, приводящей к устойчивости к циклогексимиду, может нарушить сеть взаимодействия молекул растворителя и, следовательно, изменить конформацию нуклеотидов рРНК Е-участка.

3.6.1.2. Пептидил-трансферазный Центр.

Мишенью большинства антибиотиков является ПТЦ - каталитический центр рибосомы, расположенный на большой субчастице, состоящий исключительно из высоко консервативных нуклеотидов рибосомной РНК. В реакции образования пептидной связи требуется наличие двух субстратов, это аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК, которые должны быть правильно ориентированы в А- и Р- участках пептидилтрансферазного центра, соответственно. В отличие от Бластицидина S, который связывается в Р участке большой субъединицы бактерий, архиа и эукариот, были обнаружены ингибиторы, которые связываются с А участком пептидил-трансферазного

центра (Рис. 39А) (156). Примечательно, что химически разнообразные ингибиторы имеют один и тот же участок связывания. При связывании некоторые ингибиторы А-участка вызывают сходные структурные перестроения в непосредственной близости, которые происходят в радиусе 15 Å от центра пептидилтрансферазы. Общая структурная основа ингибиторов трихотеценов, представлена Т-2 токсином, дезоксиниваленолом и веррукарином А определяет все основные контакты с нуклеотидами рРНК в связывающем участке (Рис. 39Б). В отличие от трихоценов, три других ингибитора (ликорин, нарциклазин и гомогаррингтонин) принимают различную конформацию при связывании в А участке.

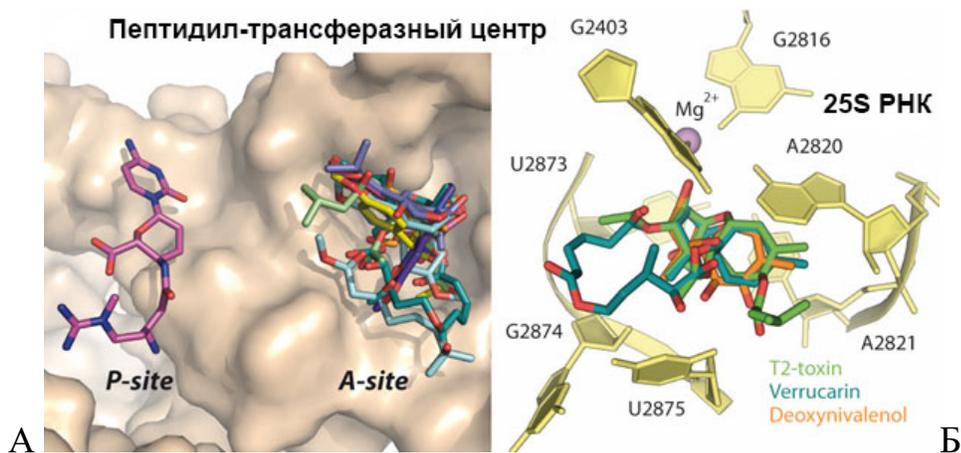


Рис. 39. Структуры ингибиторов пептидилтрансферазного центра большой субчастицы. (А) Бластицидин S связывается в Р-тРНК связывающем участке. Токсин Т-2, дезоксиниваленол, веррукарин А, ликорин, нарциклазин, гомогаррингтонин, нагилактон С и анизомицин связывается в А-тРНК связывающем участке. (Б) Участок связывания Т-2 токсина (зеленый), дезоксиниваленола (оранжевый) и веррукарина (голубой).

Если оставить в стороне структурные исследования, то большой класс ингибиторов трихотеценов вызывает особый интерес. Трихотецены-это широко распространенные микотоксины, продуцируемые грибами. Эти токсины оказывают тяжелое воздействие на зерновые культуры ответственные за значительную потерю урожая, а также серьезные заболевания у человека и животных, которые могут привести к смерти после употребления злаков (157). Трихотецены - это большая группа, состоящая примерно из 200 различных молекул. Т2-токсин является простейшим представителем трихотеценов. Трихотецены являются сильными ингибиторами трансляции мРНК у эукариот. Было показано, что вероятно они ингибируют рибосому в А-участке ПТЦ (158). Этот вывод был подтвержден мутацией резистентности в белке uL3 (W255C), в котором мутировавшие остатки находятся в непосредственной близости от ПТЦ (159-161).

Долгое время оставался открытым вопрос специфичности трихотеценов по отношению к эукариотам. Были исследованы эукариот-специфичные ингибиторы (гомогаррингтон, бруцеантин, анизомицин) на архейной 50 S субчастице (146, 162). Несмотря на использование гетерологичной экспериментальной системы, кристаллические структуры показывают расположение этих ингибиторов в расщелине ПТЦ А-участка и предполагают, что положение остатков 2054-2055 (нумерация E. coli) может определять специфичность. Кроме того, сообщалось также, что мутация W255C в белке uL3 дает резистентность к анисомицину (163). Токсин Т2 был исследован в комплексе с эукариотической рибосомой с разрешением 3.4 Å, что позволило описать участок связывания, чтобы проанализировать правила специфичности и предложить механизм действия (148).

Токсин Т2 связывается с А- участком ПТЦ. Большая часть его структуры занимает места между двумя нуклеотидами А2820 и С2821 (А2451 и С2452)

(Рис. 40). Хотя ПТЦ полностью состоит из нуклеиновой кислоты, рибосомный белок uL3 является наиболее близким к ней. Только 7,5 Å отделяет триптофан 255 белка uL3 от токсина T2 (Рис. 40).

Токсин T2 препятствует позиционированию аминоксил-тРНК в А-участке ПТЦ. Наложение тРНК на А-и Р-участки, полученные из бактериальных рибосомных структур, показывает, что Токсин T2 значительно перекрывается с аминокислотной частью ацилированной тРНК (Рис. 41 Б).

Структура А-участка ПТЦ отличается у бактерий и эукариот. В бактериях U2504 образует неканоническую пару с C2452. У эукариот это взаимодействие отсутствует, и в свою очередь U2873 (U2504) смещается и формирует стекинг с A2397 (который является цитозином в бактериях (C2055)). В результате происходит разрушение базовой пары и переориентация U2873 (U2504) у эукариот, что позволяет связывать Токсин T2 (Рис. 41 А).

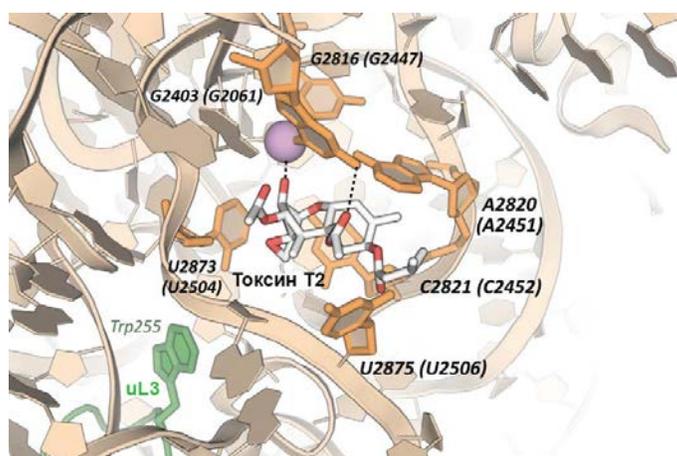


Рис. 40. T2-токсин связывается с А-участком ПТЦ. Мутация в белке uL3 (W255C) приводит к резистентности дрожжей. Фиолетовая сфера

представляет собой молекулу растворителя. Номера нуклеотидов в круглых скобках соответствуют нумерации рРНК *E. coli*.

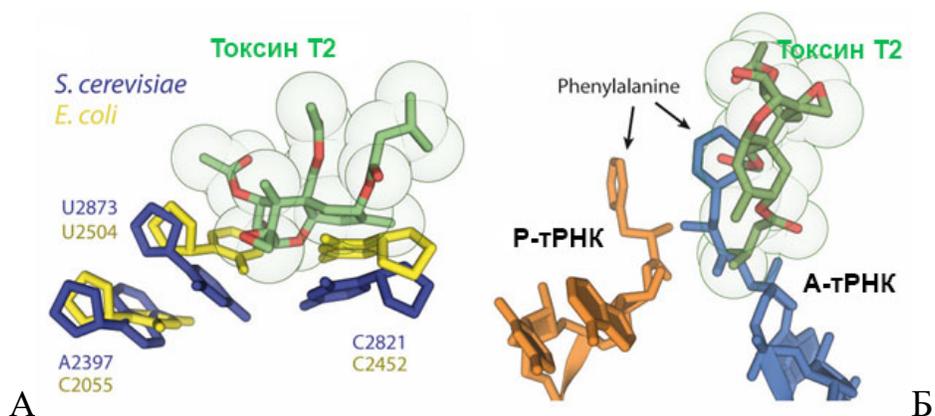


Рис. 41. Конформация нуклеотида U2504 у бактерий изменяет участок связывания, что объясняет эукариот- специфичность токсина T2. Присутствие токсина T2 в А-участке препятствует аккомодации А-тРНК в пептидилтрансферазном центре.

3.6.1.3. Декодирующий центр.

Декодирующий центр рибосомы образует геометрически ограниченную область, в которой располагается антикодонная петля аминокислот-тРНК в соответствии с кодоном мРНК расположенным в А участке рибосомы (123, 164). У бактерий антибиотики аминогликозиды изменяют точность трансляции и ингибируют транслокацию путем нарушения конформации нуклеотидов кодирующего центра. Кроме того эта активность может подавлять преждевременные прерывания трансляции вызванные стоп-мутациями, что может быть использовано для лечения наследственных расстройств (135, 165). Участок связывания аминогликозидов расположен на

спирали 44 из 18S рРНК, которая является частью центра декодирования, содержащей консервативные нуклеотиды A1755 (A1492) и A1756 (A1493) (Рис. 42А). В непосредственной близости находятся два нуклеотида, которые различаются между бактериями и эукариотами, но идентичны в дрожжах и у человека: G1645 (A1408) и A1754 (G1491) (Рис. 34А) (166, 167). Большой класс аминогликозидов можно разделить на три подгруппы согласно их химическим структурам: канамицины, неомицины и гентамицины (168). В качестве представителя канамицинов мы выбрали генетицин (G418) с высоким сродством к эукариотической рибосоме. Генетицин связывается в аминогликозидный участок и индуцирует «выпячивание» нуклеотидов A1755 и A1756 (Рис. 42Б). Структура показала стекнинг взаимодействия между кольцом I генетицина и специфичными для эукариот нуклеотидами G1645 и A1754.

Хотя некоторые аминогликозиды проявляют активность широкого спектра действия как против бактерий, так и против эукариот, большинство из них слабо или неактивны против эукариотических рибосом (169). Мы показали, что конформация G1645, которая отличается от конформации A1408 в бактериях, действует как барьер на эукариотической рибосоме запрещающий аккомодацию аминогликозидов, несущих аминогруппу в кольце 1 (Рис. 43А). В соответствии с этим наблюдением канамицины и гентамицины содержащие аминогруппу или углеродную боковую цепь в этом положении имеют ограниченное действие на эукариотическую рибосому. Тем не менее, некоторые неомицины, такие как паромомицин, содержат гидроксил в этом положении и сохраняют слабую активность к эукариотическим рибосомам. Таким образом второй структурный барьер для связывания неомицина объясняется смещением A1754 у эукариот из-за неканонического взаимодействия с C1646. Следовательно A1754 может иногда мешать

аккомодации гидроксильной группы в кольце III, которая имеется в неомицинах, что согласуется с биохимическими данными (Рис. 43Б) (166).

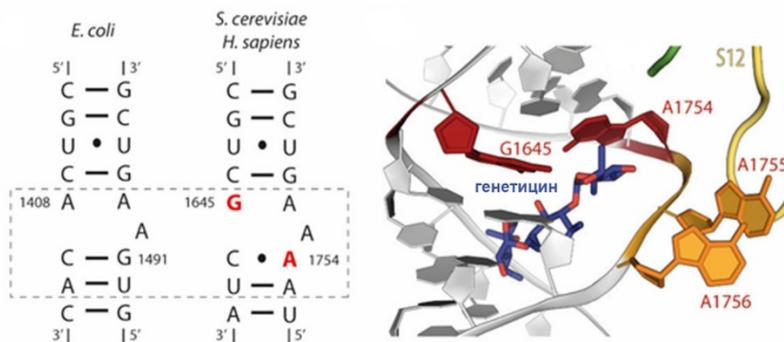


Рис. 42. (А) Участок связывания аминокликозидов у прокариот и эукариот разный. Вторичная структура спирали 44 от бактерий (16S рРНК, слева) и дрожжей и человека (18S рРНК, справа). (Б) Генетицин (синий) связывается с спиралью 44 и индуцирует «выпячивание» нуклеотидов А1755 и А1756 (оранжевый).

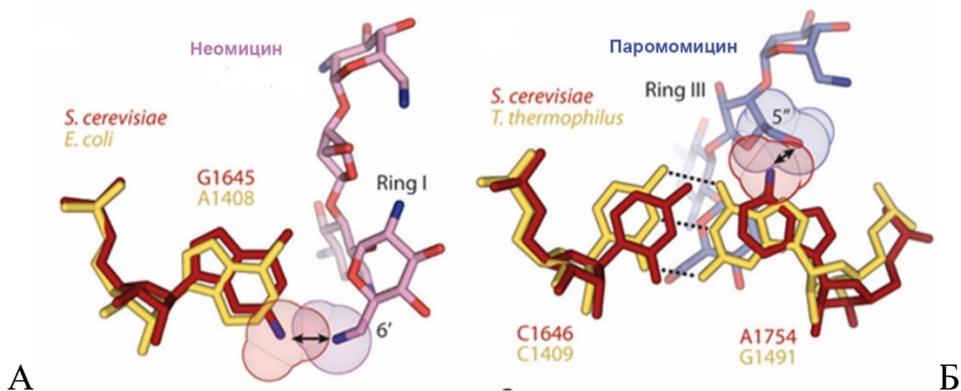


Рис. 43. (А) Конформация G1645 в дрожжах 18S рРНК запрещает связывание аминокликозидов несущих аминогруппу в кольце I, как показано для неомицина (розовый). (Б) конформация А1754 в дрожжах ограничивает

связывание аминокликозидов содержащих гидроксильную группу в кольце III, как показано для паромомицина (голубой).

3.6.1.4. Участки связывания мРНК и тРНК.

Появление дополнительных участков в рРНК и в белках, а также появление новых белков, привели к важному ремоделированию малой субчастицы эукариот, которая служит платформой для многочисленных белковых факторов и активно участвует в процессе инициации трансляции. Во время инициации субчастица связывается с мРНК и перемещается по нетранслируемой области до стартового кодона. В бактериях эдеин связывается между Р-участком и Е-участком малой субчастицы и ухудшает связывание инициаторной тРНК с Р-участком во время инициации (98, 170). В рибосоме дрожжей эдеин связывается с тем же самым участком рядом с мРНК, но принимает другую конформацию, чем на бактериальной 30S субчастице (Рис. 44А). Участок связывания эдеина образован нуклеотидами 18S рРНК, расположенными на пути мРНК. Эдеин по-разному влияет на трансляцию у прокариот и у эукариот в соответствии с тем, что механизмы инициации заметно отличаются друг от друга. Действительно, эдеин мешает распознаванию стартового кодона мешая непрерывному сканированию матрицы 40S субчастицей и мешая ассоциации рибосомных субчастиц (171).

Пактамицин и криптоплерин связываются с Е участком частично перекрываясь с участком связывания эдеина. Оба ингибитора находятся на месте связывания мРНК и взаимодействуют с рибосомой через «стекинг-взаимодействие» с G904 нуклеотидом 18S рРНК (Рис. 44Б). Пактамицин ингибитор широкого спектра действия и связывается с рибосомой бактерий и эукариот. Однако, криптоплерин был описан как специфический ингибитор эукариот (172). Структура криптоплерина, связанного с дрожжевой рибосомой

не позволяет объяснить природу его специфичности. Расположение пактамицина и криптоплерина подразумевает, что они могут мешать транслокации лигандов из Р-участка в Е-участок.

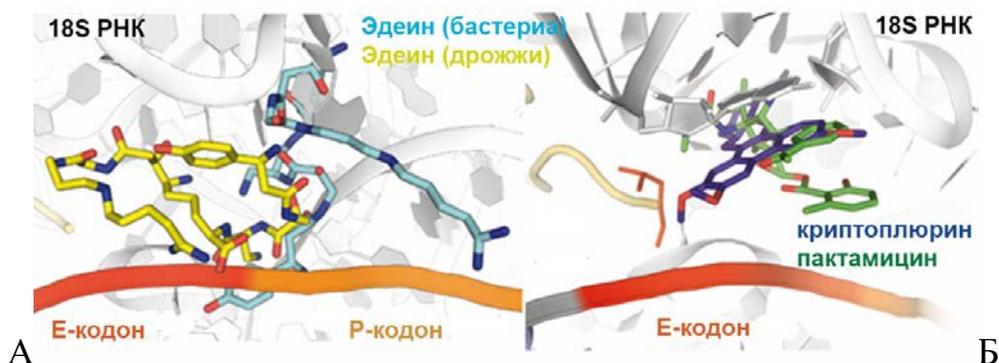


Рис. 44. (А) Эдеин принимает различную конформацию на бактериальной рибосоме (голубой) и на эукариотической рибосоме (желтый). (Б) Пактамицин (зеленый) и криптоплерин (синий) имеют один и тот же сайт связывания в Е-участке. Мутации в С-концевой части белка uS11 (красный) дают устойчивость к криптоплирину (173).

Кристаллографические исследования 16 ингибиторов дают полное описание участков связывания с рибосомой дрожжей на атомарном уровне. Были выявлены общие принципы нацеленности ингибиторов на специфические участки и даны первые объяснения селективности и устойчивости видов. Связываясь исключительно с функциональными участками на обеих субчастицах, низкомолекулярные ингибиторы нарушают работу рибосом во время цикла трансляции (Рис. 45).

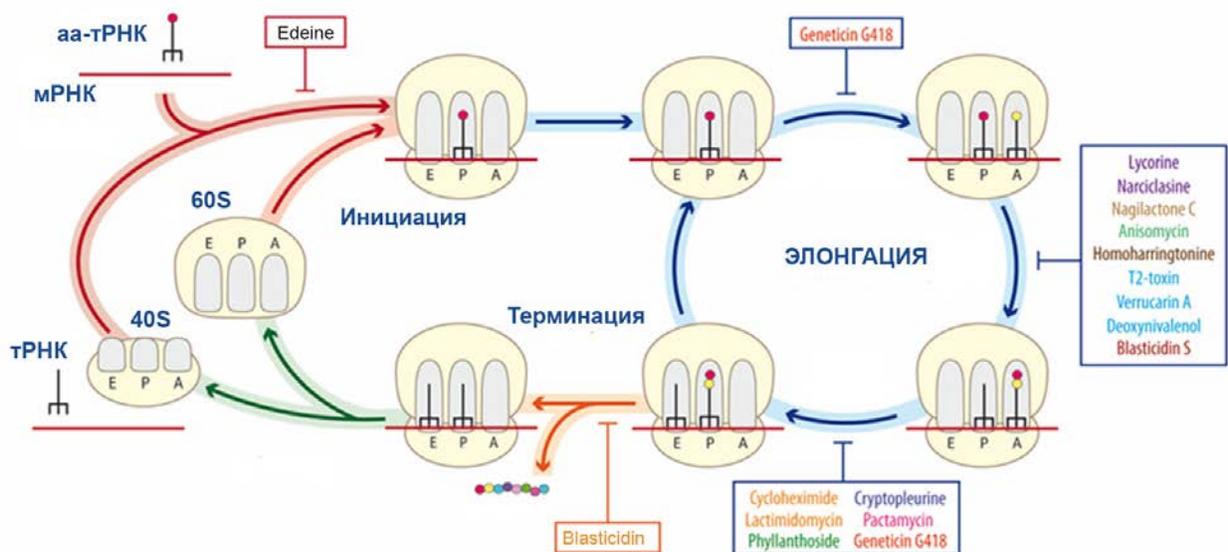


Рис. 45. Действия исследованных ингибиторов на этапы синтеза белка у эукариот.

Подобно антибиотикам, действующим против бактериальной рибосомы, ингибиторы 80S рибосом являются сложными инструментами для изучения синтеза белка в эукариотах (149). Наши исследования объясняют общие принципы взаимодействия ингибиторов с рибосомой и создают основу для структурного «проектирования» новых лекарств. Наши структуры будут способствовать развитию следующего поколения антибиотиков со сниженными побочными эффектами и новых терапевтических средств против инфекционных заболеваний, раковых заболеваний и генетических нарушений, вызванных преждевременным окончанием трансляции (135, 174-176). Таким образом, рентгено-структурный анализ высокого разрешения 80S рибосом открывает новую область исследований. Большое количество ингибиторов рибосом, безусловно, еще предстоит обнаружить и проанализировать.

3.7. Рибосомные ингибиторы как потенциальные лекарства против раковых заболеваний

Натуральные ингибиторы синтеза эукариотических белков имеют значительный терапевтический потенциал для лечения широкого спектра раковых заболеваний человека (177-179). В качестве главного примера можно привести сообщение, что в 2012 году в США Администрация контроля лекарств и продуктов питания (FDA) одобрила первый ингибитор трансляции, натуральный алкалоид гомогарингтонин для лечения хронического миелолейкоза (180). Необходимо еще раз отметить, что низкомолекулярные соединения, которые подавляют синтез белка, являются также удобными биохимическими инструментами.

3.7.1. Е-тРНК связывающий участок.

Циклогексимид и лактимидомицин широко используется в лабораторных условиях для ингибирования трансляции эукариот. Циклогексимид и лактимидомицин, проявляют сильное антипролиферативное действие путем ингибирования трансляции в эукариотических клетках. Хотя механизм ингибирования был хорошо изучен биохимическими методами, появление детальной структурной информации из кристаллографических исследований открывает дверь к разработке более селективных ингибиторов на основе понимания критических межмолекулярных взаимодействий (Рис. 35А).

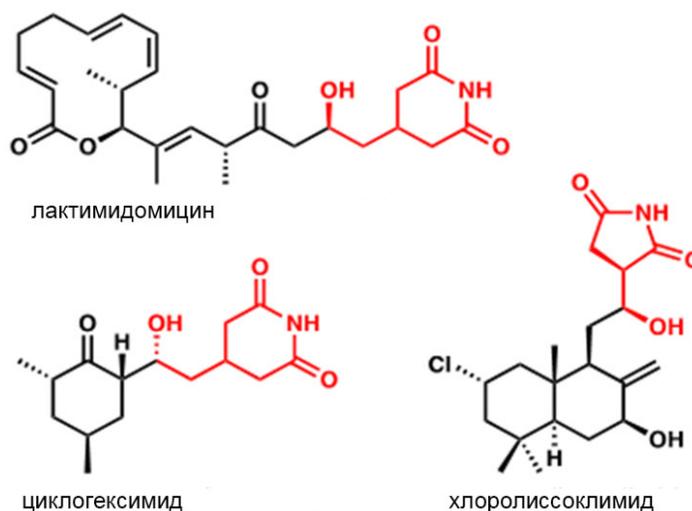


Рис. 46. Структурные формулы циклогексимида, лактимидомицина и хлоролиссоклимида.

Ранее было показано, что хлоролиссоклимид (Рис. 46) и дихлоролиссоклимид являются мощными цитотоксинами в отношении мышинового лейкоза и карциномы человека (181, 182). Хлоролиссоклимид первоначально был выделен из асцидии (морские брызги) и было показано, что он является ингибитором на этапе трансляции эукариот (183). В этом же исследовании авторы отметили структурную гомологию между хлоролиссоклимидом и хорошо изученным ингибитором трансляции циклогексими́дом. Ясно, что такие глутаримиды как циклогексими́д, лактимидомицин и сукцинимиды, как хлоролиссоклимид структурно схожи (Рис. 46). Механизм действия глутаримидов и участок связывания на эукариотической рибосоме полученный с помощью рентгено-структурного анализа был описан выше.

Учитывая структурное сходство между ингибиторами и сходство в их биохимических свойствах, казалось вероятным предположить, что хлоролиссоклимид будет связываться с рибосомой. В результате, мы

определили кристаллическую структуру рибосомы *S. cerevisiae* в комплексе с синтетическим образцом ингибитора при максимальном разрешении 3.0Å. . Как и предполагалось, участок связывания перекрывается с ССА концом E-tRNA на большой субчастице , как ранее показано для глутаримидов (Рис. 47А). Химическая структура хлоролиссоклимида была однозначно вписана в карту электронной плотности. Кристаллическая структура была получена путем совместной кристаллизации с молярным отношением ингибитор к 80S рибосоме как 30 к 1. При конечной концентрации 33 мкМ мы не наблюдали никакого вторичного связывания на рибосоме. Сравнение структур комплекса и вакантной рибосомы не выявила никаких конформационных изменений в ингибиторе и в E участке связывания. Важно отметить, что структурная информация может быть использована при разработке противоопухолевых лекарств, так как рибосомы человека и мыши в данной области структурно почти идентичны рибосоме дрожжей, используемых в наших исследованиях (Рис. 47Б).

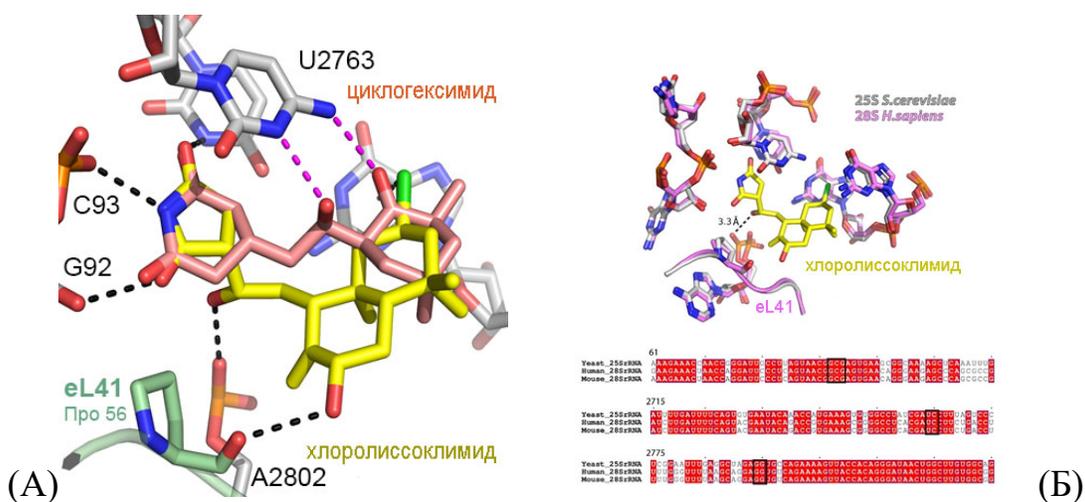


Рис. 47. (А) Сравнение взаимодействия циклогексимида и хлоролиссоклимида с рибосомой в Е участке (циклогексимид розовый, хлоролиссоклимид желтый). Прямые контакты происходят с нуклеотидами G92, C93, U2763, A2802 и G2794 25S рРНК. Хлоролиссоклимид имеет дополнительную водородную связь с рибосомным белком eL41. (Б) Структурная гомология Е участка рибосомы дрожжей и человека позволяет использовать дрожжевую рибосому для исследования ингибиторов рибосомы человека.

Сравнение участков связывания циклогексимида и лактимидомицина и хлоролиссоклимида показало аналогичную сеть взаимодействий ингибиторов и консервативных нуклеотидов 25S рРНК, а именно G92, C93 и U2763 (Рис. 47А). Хлоролиссоклимид дополнительно взаимодействует с A2802 рРНК. Мы также наблюдали две особенности взаимодействия хлоролиссоклимида с рибосомой. С7-гидроксильная группа, присутствующая на кольце, образует водородную связь с Pro56 белка eL41, и таким образом отличается от большинства других известных ингибиторов, которые исключительно связываются с рРНК. Наконец, хлор, расположенный на кольце декалина взаимодействует с G2794 25S рРНК (и, в меньшей степени, с G2793). Атом хлора находится в сторону от центра шестичленного кольца и, по-видимому, образует галоген-π взаимодействие с остатком гуанина (184).

3.7.2. Пептидил-трансферазный центр.

Морские натуральные продукты широко используются для выделения новых лекарственных препаратов, которые также могут использоваться в химической биологии благодаря их способности влиять на функции

специфических белков мишеней (185, 186). Агеластатин А (AglA) - это структурно уникальный бромированный алкалоид, выделенный из морской губки *Agelas dendromorpha*. Было показано, что он обладает мощной цитотоксической активностью в отношении некоторых раковых клеточных линий (187-189). Однако, несмотря на свою многообещающую противоопухолевую активность, молекулярный механизм действия Агеластатина А (AglA) оставался долгое время неизвестным.

С помощью бесклеточной системы трансляции *in vitro* мы показали, что AglA ингибирует синтез белка. Далее мы обнаружили, что AglA ингибирует именно стадию элонгации трансляции в дрожжах. Эти эксперименты позволили предположить, что пептидилтрансферазный центр является потенциальным участком связывания ингибитора. Рентгено-структурный анализ и молекулярное моделирование были использованы для решения структуры комплекса эукариотической рибосомы и AglA. Результаты подтвердили наше предположение о рибосоме, как молекулярной мишени AglA, и таким образом был предложен механизм ингибирования трансляции, как основной механизм противоопухолевой активности Агеластатина.

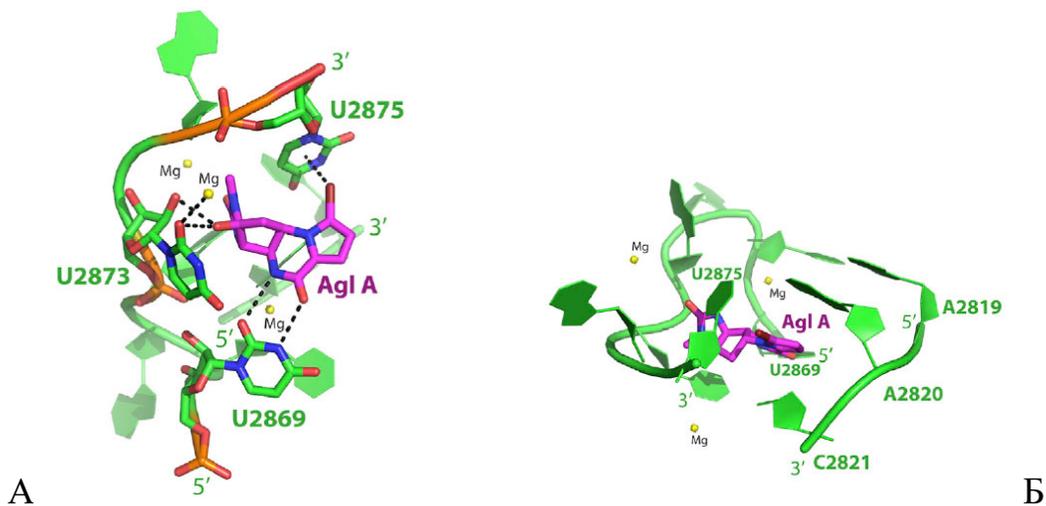


Рис. 48. (А) AglA (розовый) образует водородные связи с U2869 и U2873 и «стекинг- взаимодействие» с U2875 25S рРНК (зеленый цвет), а также электростатические взаимодействия с ионами магния (желтый цвет). (Б) «стекинг- взаимодействие» между молекулой AglA и A2820 и C2821 25S рРНК.

Полученная структура высокого разрешения позволила нам окончательно определить место связывания AglA в рибосоме, а именно как А-участок пептидил-трансферазного центра. AglA образует множество связей с рРНК включая: U2875, U2869 и U2873 (Рис. 48А) и A2820 и C2821 (Рис. 48Б). Сравнение структуры ПТЦ пустой рибосомы и структуры комплекса позволило определить изменения ориентации ряда нуклеотидов при связывании Агеластатина А (Рис. 49). Нуклеотид U2875 25S рРНК претерпевает серьезную перестройку и отворачивается от центра ПТЦ, в то время как соседние нуклеотиды сохраняют свою исходную конформацию. Кроме того, AglA индуцирует перемещение A2820, C2821 и, в меньшей степени, перемещение соседних нуклеотидов, для того чтобы создать устойчивые контакты с большой субчастицей. Более того, переворачивание вверх U2875 в структуре индуцирует смещение A2404, вероятно, в результате стерических взаимодействий между этими нуклеотидными основаниями.

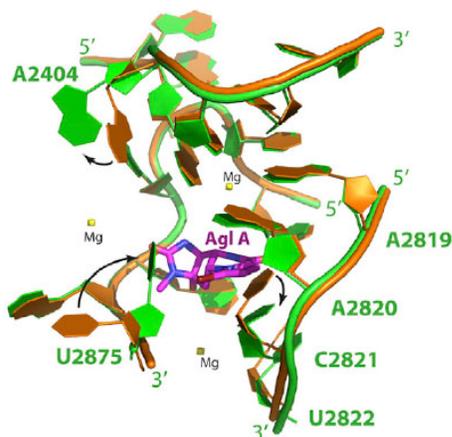


Рис. 49. Наложение структуры пустой рибосомы (оранжевый цвет) и комплекса рибосомы с AglA (зеленый цвет), показывает основные изменения ориентации нуклеотидов A2404, C2821 и U2875 (черные стрелки) индуцируемые связыванием AglA (розового цвета) с ПТЦ.

Алкалоиды, выделенные из растений семейства *Amaryllidaceae* имеют огромный потенциал в качестве терапевтических средств для лечения болезней человека. Ранее мы исследовали нарциклазин (NAR) в комплексе с эукариотической рибосомой и показали его взаимодействия с ПТЦ. Нарциклазин и гемантамин имеют схожие химические структуры (Рис. 50). Гемантамин (НАЕ) был изучен как новое противоопухолевое средство благодаря своей способности нарушать устойчивость раковых клеток к апоптозу. Биохимические эксперименты предположили, что мишенью гемантамина является рибосома (190). Кроме того оказалось, что гемантамин также ингибируют специфически биогенез (созревание) рибосомы, запускающий реакцию ядрышкового стресса и приводит к стабилизации белка p53 в раковых клетках (191).

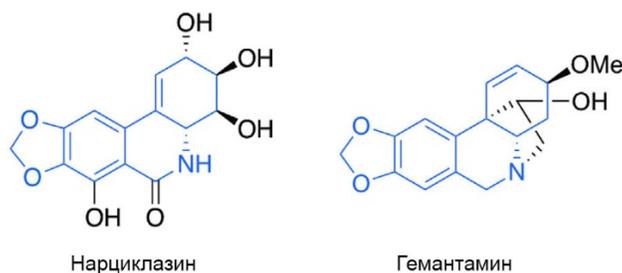


Рис. 50. Нарциклазин и Гемантамин имеют одинаковую химическую основу и относятся к семейству амариллисовых соединений.

Мы использовали рентгено-структурный анализ для решения структуры гемантамина в комплексе с рибосомой дрожжей. Эта структура показывает, что гемантамин связывается с А-участком на большой субчастице в пептидил-трансферазном центре. Оказалось, что имеются существенные различия в связывании нарциклазина и гемантамина с консервированными нуклеотидами 25S рРНК в А-участке ПТЦ (Рис. 51А). Гемантамин зажат между нуклеотидами U2875 и C2821, где ароматическое кольцо ингибитора, может образовывать «стекинг» с нуклеотидными основаниями. Для этого при связывании ингибитора меняется положение основания нуклеотида U2875 (Рис. 51Б). Кроме того, образуется водородная связь с основанием U2873.

Используя полученную структуру, мы стремились понять причину, по которой гемантамин не эффективен против бактерий, хотя прокариотические и эукариотические рибосомы имеют в основном консервативные нуклеотиды в ПТЦ. В бактериях имеется замена U2822 на A2453, где меняется положение основания (Рис. 51В). Эта мутация не позволяет консервативному нуклеотиду U2504 в бактериях (U2873 в дрожжах) принять конформацию аналогично той, что и в рибосоме дрожжей. Вследствие этого, U2504 явно стерически

столкнется с гемантамином, что препятствует его связыванию с бактериальной рибосомой.

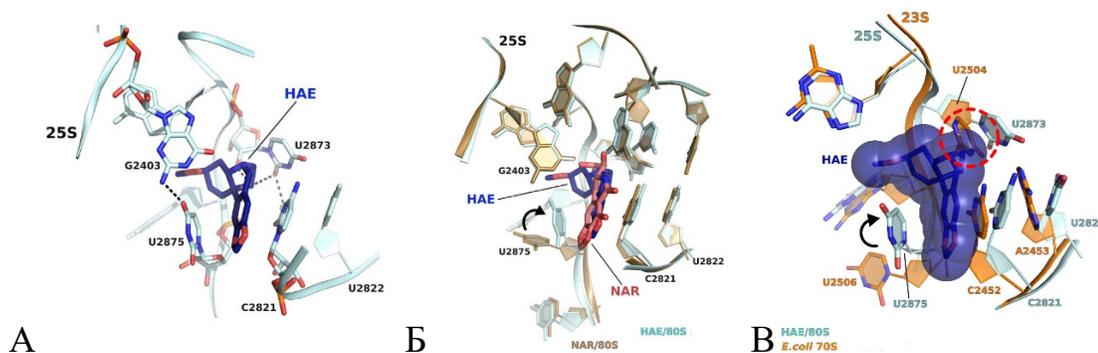


Рис. 51. (А) Гемантамин связывается исключительно с остатками рРНК в А-участке ПТЦ. Ароматическое кольцо гемантамина формирует «стекинг-взаимодействие» с нуклеотидными основаниями U2875 и C2821. Водородная связь с основанием U2873. (Б) Сравнение структур ПТЦ в присутствии нарциклазина и гемантамина. Меняется положение основания нуклеотида U2875. (В) Сравнение структуры РТЦ дрожжей и *E.coli* (моделирование) в присутствии гемантамина.

3.7.3. Участок связывания мРНК и тРНК.

Было известно, что Амикумацин А - это антибиотик, который, нацелен на бактериальные рибосомы и ингибирует транслокацию тРНК и мРНК. Оказалось, что он ингибирует также трансляцию в дрожжах. Мы определили структуру комплекса Амикумацина А в комплексе дрожжевой рибосомой с разрешением 3.1 Å. Также показали, что линии раковых клеток человека более восприимчивы к ингибированию этим соединением по сравнению с не раковыми. Этот результат может быть использован в качестве отправной точки для разработки производных амикумацина для клинических испытаний.

Результаты исследований комплекса Амикумацина А с дрожжевой рибосомой показали, что молекула ингибитора связывается с Е-участком малой рибосомной субчастицы (Рис. 52). Амикумацин А взаимодействует в основном с остатками рРНК в спиральях h23 и h24. Он участвует в «стекинге» с G904 (G693 в бактериях) спирали h23. Антибиотик формирует также водородные связи с нуклеотидами U999 (U788), U1769 (U1506), A1005 (A794) и C1006 (C795).

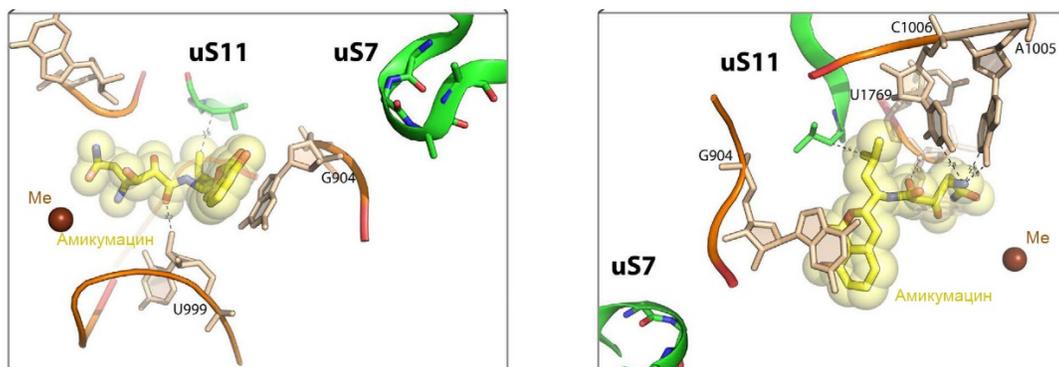


Рис. 52. Связывающий участок Амикумацина А- на Е-участке малой рибосомной субчастицы. Вид со стороны «головы» малой субчастицы показана слева, вид с внутренней стороны субчастицы показан справа. Амикумацин А показан в желтом цвете.

Мы сравнили структуру Амикумацина А, связанного с пустой рибосомой дрожжей, с аналогичной структурой бактериальной рибосомы из *Thermus thermophilus* содержащей матрицу и тРНК (192). Оказалось, что конформация, принятая амикумацином А в бактериальных и эукариотических рибосомах, очень похожа. Примечательно, что контакты Амикумацина А с

эукариотической рибосомой сохраняются и при отсутствии функциональных лигандов. Различия в бактериальных и дрожжевых рибосомах были обнаружены только в белках uS11 и uS7, которые участвуют в формировании канала для связывания матричной РНК в Е-участке рибосомы.

3.8. Аминогликозиды как потенциальные лекарства для лечения генетических заболеваний, вызванных появлением стоп кодонов в смысловых генах.

Трансляция гена завершается, когда один из трех стоп-кодонов, UAA, UGA или UAG, входит в рибосомный А-участок (Рис. 53). В отличие от смысловых кодонов, которые распознаются тРНК, стоп-кодона узнаются белковыми факторами терминации (193). Эффективность терминации трансляции зависит от конкуренции за узнавание стоп-кодонов между факторами терминации и тРНК, которые могут ошибаться при декодировании. У эукариот два фактора терминации, eRF1 и eRF3 (194). Белок eRF1 распознает стоп-кодона через свой N-концевой домен и осуществляет пептидил-тРНК гидролиз путем активации пептидилтрансферазного центра рибосомы через свои консервативные домены NIKS и GGQ (Рис. 45) (195).

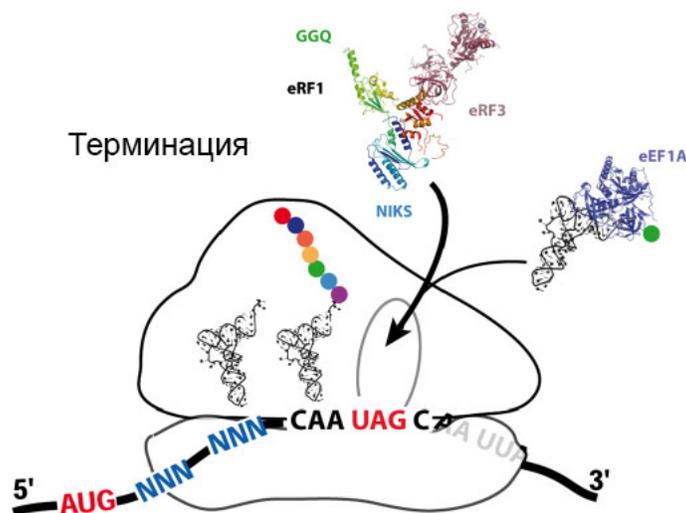


Рис. 53. Принципиальная схема конкуренции между окончанием трансляции и прохождением стоп кодона. Стоп кодон (UAG) расположен в А-участке, тогда как Р - и Е – участки заняты тРНК. Естественный супрессор терминации - тРНК в комплексе с фактором элонгации eEF1A. Антибиотики аминогликозиды способствуют связыванию рибосомой естественных супрессорных тРНК.

Многие генетические и раковые заболевания связаны с мутациями в генах и появлением стоп кодона в середине смысловой последовательности мРНК. В этих случаях рибосома не может синтезировать полную цепь белка, а завершает синтез белка в месте появления первого стоп кодона. В целом антибиотики аминогликозиды вызывают появление ошибок при работе рибосомы, и в том числе могут способствовать сделать ошибку при считывании «стоп» кодона и вместо фактора терминации связывать неправильную тРНК. Использование препаратов для индуцирования ошибок для продолжения трансляции проложило бы путь к разработке многих новых протоколов лечения. Действительно, известно, что такие заболевания

составляют более 10% наследственных заболеваний, включая муковисцидоз, гемофилию и мышечную дистрофия Дюшенна (196). Было показано, что паромомицин и гентамицин частично восстанавливают синтез функционального белка из мутантного гена со «стоп» мутацией в клетках млекопитающих. В настоящее время много исследовательских групп занимаются поиском химических компонентов, обладающих такими свойствами для проведения клинических испытаний. Наша группа исследовала центры связывания ряда аминогликозидных антибиотиков (паромомицин, генетицин (G418), гентамицин и TC007) на дрожжевой рибосоме. Предполагалось, что антибиотики будут связываться в Декодирующем участке рибосомы. Однако было обнаружено несколько дополнительных центров связывания для каждого антибиотика внутри больших и малых субъединиц (197). Наличие нескольких центров связывания аминогликозидов на рибосоме может объяснить побочные эффекты от лекарственных средств, разработанных на основе этих антибиотиков. Конечно же, нарушение митохондриальной трансляции так же рассматривается, как одна из основных причин побочных эффектов.

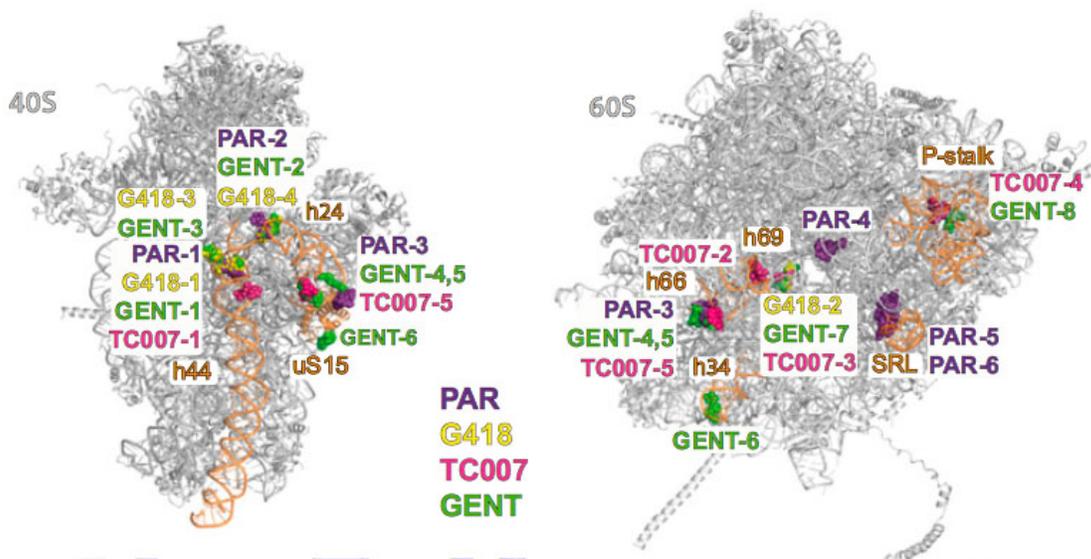


Рис. 54. Центры связывания паромомицина (PAR, фиолетовый), G418 (желтый), TC007 (пурпурный) и гентамицина (GENT, зеленый) на рибосомных субчастицах. Вид со стороны контакта субчастиц.

На рисунке (Рис. 54) приведены участки связывания аминогликозидов на рибосоме, включая вторичные участки связывания. Первичные участки связывания локализованы в декодирующем центре рибосомы. Например, паромомицин связывается внутри спирали 44 малой субчастицы (Рис. 55А), также как в бактериальной рибосоме. Кольцо I находится в «стекинге» с нуклеотидом A1754. Нуклеотиды A1756 и A1755 «выпячены» из спирали 44. Гентамицин, другой антибиотик исследуемого ряда, также связывается внутри спирали 44, но его взаимодействия с РНК отличается от паромомицина (Рис. 55Б). Он располагается выше по спирали 44 и взаимодействует с нуклеотидами G1642, C1641 и A1756.

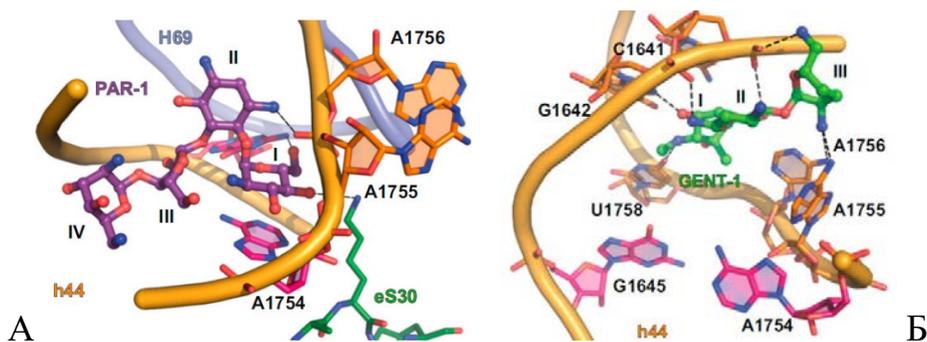


Рис. 55. (А) Связывание паромомицина (PAR) со спиралью 44 рибосомы *S. cerevisiae*. Паромомицин окрашен в фиолетовый цвет, кольца I, II, III и IV паромомицина отмечены. Кольцо I находится в «стекинге» с A1754. Нуклеотиды A1756 и A1755 «выпячены» из спирали 44. Спираль H69 большой рибосомной субчастицы находится рядом с декодирующим участком

малой субчастицы. Эукариот - специфичный белок eS30 также участвует в стабилизации антибиотика. (Б) Связывание гентамицина со спиралью 44 рибосомы. Кольца I, II и III гентамицина отмечены, также как и водородные связи с нуклеотидами G1642, C1641 и A1756. Нуклеотиды A1756 и A1755 также «выпячены» из спирали 44.

Анализ вторичных участков связывания аминогликозидов показал, что они могут связываться с пептидным туннелем рибосомы (Рис. 56А). Пептидный туннель начинается с пептидил-трансферазного центра, функцию которого могут ингибировать эти антибиотики. Мы наблюдали связывание с пептидным туннелем гентамицина, G418 и TC007. Паромомицин не был обнаружен в туннеле, вероятно, что только аминогликозиды с тремя кольцами могут связываться в этом участке. Суперпозиция со структурой эритромицина в туннеле большой субчастицы *Haloarcula marismortui* показало, что аминогликозиды связываются с противоположными сторонами стенки выходного туннеля.

Так же было показано, что группа аминогликозидов паромомицин, генетицин (G418) и гентамицин связываются с E-участком малой рибосомной субчастицы, мешая связыванию или сканированию матричной РНК или транслокации (Рис. 56Б).

Результаты структурных исследований аминогликозидов с эукариотической рибосомой послужат основой для изучения молекулярных механизмов действия аминогликозидов у эукариот. Хотя нарушение митохондриальной трансляции рассматривается, как одна из основных причин побочных эффектов, вызванных аминогликозидами в эукариотических клетках, наши данные расширяют область объяснений их действия на рибосомы. Вероятно, аминогликозиды с одной стороны помогают рибосомам

допускать ошибки при трансляции, а с другой стороны могут блокировать работу рибосом, ингибируя ее основные функции.

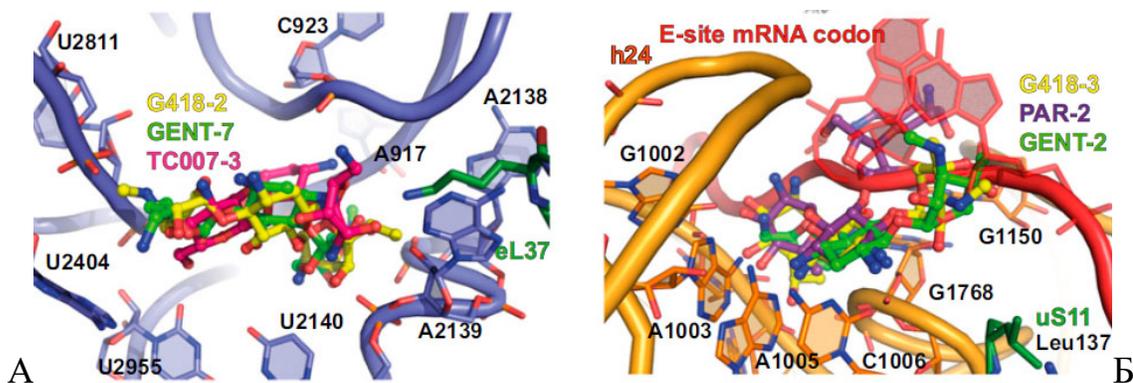


Рис. 56. (А) Связывание Гентамицина, G418 и TC007 с пептидным туннелем рибосомы. G418 (желтый), гентамицин (зеленый) и TC007 (пурпурный). Большая рибосомная субъединица окрашена в синий цвет. Специфичный для эукариот белок eL37 окрашен в зеленый цвет. (Б) Связывание Паромомицина (фиолетовый), Гентамицина и G418 в E участке мРНК. мРНК окрашена в красно-коричневый цвет. Субчастица 40S окрашена в оранжевый цвет.

3.9. Заключение.

Использование структурной информации эукариотических рибосом на атомарном уровне для разработки новых лекарственных средств находится на начальной стадии развития. Наша группа остается пока единственной в мире, кто проводит исследования рибосомных ингибиторов на эукариотической рибосоме методом рентгено-структурного анализа. Наш подход позволяет получать достоверную информацию о деталях взаимодействия будущих лекарств с мишенью. Сложность метода остается по-прежнему в кристаллизации рибосом и получении структурных данных высокого разрешения. Последнее время появились работы по изучению рибосомных комплексов с перспективными ингибиторами для разработки лекарств методом крио-электронной микроскопии. Перспективность этого направления связана с менее сложным способом сбора структурной информации рибосомных комплексов высокого разрешения. Однако, достоверность этих результатов нуждается в дальнейших доказательствах концепции. При этом основным барьером является невозможность работы с большим количеством образцов одновременно и длительность обработки данных.

ВЫВОДЫ

1. Решена кристаллическая структура дрожжевой рибосомы 2.8 – 3.0 Å разрешения.
2. Построена атомарная модель 80S рибосомы эукариот, содержащая 79 индивидуальных рибосомных белков и 5500 нуклеотидов четырех рибосомных РНК.
3. Исследованы центры связывания главных функциональных лигандов таких, как матричная РНК и транспортная РНК на рибосоме и предложены механизмы функционирования 16 ингибиторов эукариотической рибосомы.
4. Предложены правила специфичности для ингибиторов декодирующего центра и пептидил-трансферазного центра эукариотической рибосомы.
5. Исследованы центры связывания на рибосоме и предложены механизмы функционирования 4 новых веществ, как потенциальных антираковых препаратов.
6. Исследованы центры связывания на рибосоме 4 аминогликозидов, как потенциальных ингибиторов для лечения генетических заболеваний, связанных с появлением «стоп» мутаций в смысловых последовательностях генов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Pellegrino S, Meyer M, Könst ZA, Holm M, Voora VK, Kashinskaya D, Zanette C, Mobley DL, Yusupova G, Vanderwal CD, Blanchard SC, Yusupov M (2019) Understanding the role of intermolecular interactions between lissoclimides and the eukaryotic ribosome. *Nucleic Acids Res.* 47, 3223-3232.
2. Pellegrino S, Meyer M, Zorbas C, Bouchta SA, Saraf K, Pelly SC, Yusupova G, Evidente A, Mathieu V, Kornienko A, Lafontaine DLJ, Yusupov M (2018) The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure*, 26, 416-425.
3. Prokhorova I, Altman RB, Djumagulov M, Shrestha JP, Urzhumtsev A, Ferguson A, Chang CT, Yusupov M, Blanchard SC, Yusupova G (2017) Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 10899-10908.
4. Erales J, Marchand V, Panthu B, Gillot S, Belin S, Ghayad SE, Garcia M, Laforêts F, Marcel V, Baudin-Baillieu A, Bertin P, Couté Y, Adrait A, Meyer M, Therizols G, Yusupov M, Namy O, Ohlmann T, Motorin Y, Catez F, Diaz JJ (2017) Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity: Control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 12934-12939.
5. Könst Z A, Szklarski A R, Pellegrino S, Michalak S E, Meyer M, Zanette C, Cencic R, Nam, Horne D A, Pelletier J, Mobley D L, Yusupova G, Yusupov M, Vanderwal D C. (2017) Synthesis Facilitates an Understanding of the Structural Basis for Translation Inhibition by the Lissoclimides. *Nat Chem*, 9, 1140-1149.

6. McClary B, Zinshteyn B, Meyer M, Jouanneau M, Pellegrino S, Yusupova G, Schuller A, Reyes JCP, Lu J, Guo Z, Ayinde S, Luo C, Dang Y, Romo D, Yusupov M, Green R, Liu JO. (2017) Inhibition of Eukaryotic Translation by the Antitumor Natural Product Agelastatin A. *Cell Chem Biol*, 24, 605-613.
7. Yusupova G, Yusupov M. (2016) Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 372, 1716. Review.
8. Melnikov S, Mailliot J, Rigger L, Neuner S, Shin B, Yusupova G, Dever T, Micura R, Yusupov M (2016) Molecular insights into protein synthesis with proline residues. *EMBO Rep*, 17, 1776-1784.
9. Prokhorova IV, Akulich KA, Makeeva DS, Osterman IA, Skvortsov DA, Sergiev PV, Dontsova OA, Yusupova G, Yusupov MM, Dmitriev SE (2016) Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome. *Sci Rep*. 6, 27720.
10. Melnikov S, Mailliot J, Shin BS, Rigger L, Yusupova G, Micura R, Dever TE, Yusupov M (2016) Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. *J Mol Biol*. 428' 3570-3576.
11. Mailliot J, Garreau de Loubresse N, Yusupova G, Meskauskas A, Dinman JD, Yusupov M (2016) Crystal Structures of the uL3 Mutant Ribosome: Illustration of the Importance of Ribosomal Proteins for Translation Efficiency. *J Mol Biol*. 428, 2195-202.
12. Yusupova G and Yusupov M (2015) Ribosome biochemistry in crystal structure determination. *RNA*, 21, 771-773.

13. Garreau de Loubresse N, Prokhorova I, Holtkamp W, Rodnina MV, Yusupova G, Yusupov (2014). Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature*. 513, 517-522.
14. Yusupova G, Yusupov M (2014) High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. *Annu Rev Biochem*. 83, 467-486.
15. Ban N, Beckmann R, Cate JH, Dinman JD, Dragon F, Ellis SR, Lafontaine DL, Lindahl L, Liljas A, Lipton JM, McAlear MA, Moore PB, Noller HF, Ortega J, Panse VG, Ramakrishnan V, Spahn CM, Steitz TA, Tchorzewski M, Tollervey D, Warren AJ, Williamson JR, Wilson D, Yonath A, Yusupov M (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 24, 165-169.
16. Jenner L, Melnikov S, Garreau de Loubresse N, Ben-Shem A, Iskakova M, Urzhumtsev A, Meskauskas A, Dinman J, Yusupova G and Yusupov M (2012) Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr Opin Struct Biol*. 22, 759-767.
17. Melnikov S, Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 560-567
18. Ben-Shem, A., Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 80S ribosome. "Ribosomes. Structure, Function, and Dynamics". Rodnina/Wintermeyer/Green (Eds). Springer-Verlag/Vien, Austria, 75-82.
19. Ben-Shem A, Garreau De Loubresse N, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2011) The complete structure of the eukaryotic ribosome at 3 Å resolution. *Science*, 334, 1524-1529.
20. Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M (2010) Crystal structure of eukaryotic ribosome. *Science*, 330, 1203-1209.

21. Jenner L, Demeshkina N, Yusupova G, Yusupov M (2010) Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 1072-1078.
22. Demeshkina N, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. (2010) Interactions of the ribosome with mRNA and tRNA. *Current Opinion in Structural Biology*, 20, 1–8.
23. Jenner L, Demeshkina N, Yusupova G, Yusupov M. (2010) Structural aspects of messenger RNA maintenance by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 555-560.
24. Simonetti A, Marzi S, Jenner L, Myasnikov AG, Romby P, Yusupova G, Klaholz BP, Yusupov M (2009) Structural view to initiation of translation in bacteria (Review) *Cell.Mol.Life Sci.*, 66, 423-36.
25. Simonetti A, Marzi S, Myasnikov AG, Fabbretti A, Yusupov M, Gualerzi CO, Klaholz BP. (2008) Structure of the 30S translation initiation complex. *Nature*, 455, 416-420.
26. Jenner L, Rees B, Yusupov M and Yusupova G (2007) mRNA conformations in the ribosomal E-site revealed by X-ray crystallography. *EMBO reports*, 8: 846-850.
27. Marzi S, Myasnikov AG, Serganov A, Ehresmann C, Romby P, Yusupov M and Klaholz BP (2007) Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to a dedicated site on the ribosome. *Cell*, 130: 1019-1031.
28. Yusupova G, Jenner L, Yusupov M (2007) Messenger RNA movement on the ribosome. *Molecular Biology*, 41, 240-249.
29. Yusupova G, Jenner L, Rees B, Moras D, Yusupov M (2006) Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature*, 444: 391-394.

30. Yusupov M (2005) X-ray structure and function study of the ribosome. Puglisi JD, Ed. Structure, Dynamics and Function of Biological Macromolecules and Assemblies. IOS Press, pp 157-175.
31. Rees B, Jenner L, Yusupov M (2005) Bulk-solvent correction in large acromolecular structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 61:1299-301.
32. Jenner L, Romby P, Rees B, Schulze-Briese C, Springer M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moras D, Yusupova G, Yusupov M (2005) Translational Operator of mRNA on the Ribosome: How Repressor Protein excludes Ribosome Binding. *Science*, 308:120-123.
33. Noller H.F, Yusupov M, Yusupova G, Baucom A, Lieberman K, Lancaster L, Dallas A, Fredrick K, Earnest TN, Cate JHD (2001) The Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution and its Interactions with Functional Ligands. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: The Ribosome*, Vol. 66. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp.57-66.
34. Noller HF, Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Cate JH (2001) Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett*, 514:11-16. Review.
35. Yusupova GZ, Yusupov MM, Cate JH, Noller HF (2001) The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell*, 106:233-241.
36. Yusupov M, Yusupova G, Baucom A, Liberman K, Lancaster L, Earnest T, Cate J, Noller H (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5Å resolution. *Science*, 292:883-896.
37. Noller H, Cate J, Dallas A, Culver G, Earnest T, Green R, Holmberg L, Joseph S, Lancaster L, Lieberman K, Merryman C, Newcomb L, Samaha R, Ahsen U, Yusupov M, Yusupova G, Wilson K (2000) Studies on the

- structure and function of ribosomes by combined use of chemical probing and X-ray crystallography. Garrett RA, Douthwaite SR, Liljas A, Matheson AT, Moore PB, Noller HF, Eds, The Ribosome: structure, function, antibiotics and cellular interactions. American Society for microbiology, Washington, D.C., pp. 129-150.
38. Culver G., Cate J., Yusupova G., Yusupov M. and Noller H. (1999) Identification of an RNA-Protein Bridge Spanning the Ribosomal Subunit Interface Science, 285: 2133-2136.
39. Cate J., Yusupov M., Yusupova G., Earnest T. and Noller H. (1999) X-ray Crystal structures of 70S Ribosome Functional Complexes. Science, 285: 2095-2104.
40. Yusupova G, Yusupov M, Spirin A, Ebel JP, Moras D, Ehresmann C and Ehresmann B (1991) Formation and crystallization of *Thermus thermophilus* 70S ribosome/ tRNA complexes. FEBS Lett, 290: 69-72.
41. Yusupov MM, Garber MB, Vasiliev VD and Spirin AS (1991) *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies. Biochimie, 73: 887-897. (Review).
42. Trakhanov SD, Yusupov MM, Shirokov VA, Garber MB, Mitschler A, Ruff M, Thierry JC and Moras D (1989) Preliminary X-ray investigation of 70S ribosomal crystals from *Thermus thermophilus*. J.Mol.Biol., 209: 327-328.
43. Yusupov MM, Tischenko SV, Trakhanov SD, Riazantsev SN, Garber MB, (1988) A new crystallin form of 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*. FEBS Lett, 238: 113-115.
44. Yusupov MM, Trakhanov SD, Agalarov SC, Garber MB, Riazantsev SN, Tischenko SV and Shirokov VA (1987) Crystallization of 70S

ribosome and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*.
FEBS Lett, 220: 319-322.

45. Yusupov MM, Trakhanov SD, Barinin VV, Boroviagin BD, Garber MB, Sedelnikova SE, Selivanova OM, Tischenko SV, Shirokov VA and Edintsov MM. (1986) Crystallization of the 30S subunits of *Thermus thermophilus* ribosomes. Dokl. Akad. Nauk (USSR), 292: 1271-1274
46. Gogia ZV, Yusupov MM and Spirina TN (1986) Structure of *Thermus thermophilus* ribosomes. Method of isolation and purification of ribosomes. Molekul. biol. (USSR), 20, 519-526.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Uncategorized References

1. A. S. Spirin, Ribosome as a molecular machine. *FEBS Lett* **514**, 2-10 (2002).
2. H. F. Noller, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, J. H. Cate, Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett* **514**, 11-16 (2002).
3. H. F. Noller, Structure of ribosomal RNA. *Annu Rev Biochem* **53**, 119-162 (1984).
4. L. Giri, W. E. Hill, H. G. Wittmann, B. Wittmann-Liebold, Ribosomal proteins: their structure and spatial arrangement in prokaryotic ribosomes. *Adv Protein Chem* **36**, 1-78 (1984).
5. V. Ramakrishnan, S. W. White, Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. *Trends Biochem Sci* **23**, 208-212 (1998).
6. M. M. Yusupov, M. B. Garber, V. D. Vasiliev, A. S. Spirin, Thermus thermophilus ribosomes for crystallographic studies. *Biochimie* **73**, 887-897 (1991).
7. V. D. Vasiliev, Electron microscopy study of 70 S ribosomes of Escherichia coli. *FEBS Lett* **14**, 203-205 (1971).
8. V. D. Vasiliev, Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data. *Acta Biol Med Ger* **33**, 779-793 (1974).
9. J. A. Lake, Ribosome structure determined by electron microscopy of Escherichia coli small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. *J Mol Biol* **105**, 131-139 (1976).
10. J. Frank, P. Penczek, R. Grassucci, S. Srivastava, Three-dimensional reconstruction of the 70S Escherichia coli ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA. *J Cell Biol* **115**, 597-605 (1991).

11. J. Frank *et al.*, A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome. *Nature* **376**, 441-444 (1995).
12. H. Stark *et al.*, The 70S Escherichia coli ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure* **3**, 815-821 (1995).
13. V. D. Vasiliev, V. E. Kotliansky, The 30 S ribosomal subparticle retains its main morphological features after removal of half the proteins. *FEBS Lett* **76**, 125-128 (1977).
14. M. M. Yusupov, A. S. Spirin, Are there proteins between the ribosomal subunits? Hot tritium bombardment experiments. *FEBS Lett* **197**, 229-233 (1986).
15. A. Yonath, J. Mussig, H. G. Wittmann, Parameters for crystal growth of ribosomal subunits. *J Cell Biochem* **19**, 145-155 (1982).
16. B. Yusupov M, V.V., Borovyagin, B.D., Garber, M. Sedelnikova, S., Selivanova, O., Tischenko, S., Shirokov, V., Edintsov, M. , Crystallization of the 30S subunits of Thermus thermophilus ribosomes. . *Dokl Akad Nauk SSSR* **292**, 1271-1274 (1987).
17. Y. M. Trakhanov SD, Agalarov S, Garber M, Ryazantzev S, et al. , Crystallization of 70S ribosomes and 30S ribosomal subunits from Thermus thermophilus. *FEBS Lett* **220**, 319-322. (1987).
18. J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T. N. Earnest, H. F. Noller, X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* **285**, 2095-2104 (1999).
19. M. M. Yusupov *et al.*, Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883-896 (2001).
20. B. T. Wimberly *et al.*, Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339 (2000).

21. W. M. Clemons, Jr. *et al.*, Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* **400**, 833-840 (1999).
22. N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920 (2000).
23. N. Ban *et al.*, Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**, 841-847 (1999).
24. G. Z. Yusupova, M. M. Yusupov, J. H. Cate, H. F. Noller, The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* **106**, 233-241 (2001).
25. S. Melnikov *et al.*, One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 560-567 (2012).
26. D. N. Wilson, R. Beckmann, The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 274-282 (2011).
27. F. Brandt, L. A. Carlson, F. U. Hartl, W. Baumeister, K. Grunewald, The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells. *Mol Cell* **39**, 560-569 (2010).
28. F. Brandt *et al.*, The native 3D organization of bacterial polysomes. *Cell* **136**, 261-271 (2009).
29. D. Fourmy, M. I. Recht, S. C. Blanchard, J. D. Puglisi, Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274**, 1367-1371 (1996).
30. S. C. Agalarov, G. Sridhar Prasad, P. M. Funke, C. D. Stout, J. R. Williamson, Structure of the S15,S6,S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain. *Science* **288**, 107-113 (2000).

31. B. T. Wimberly, S. W. White, V. Ramakrishnan, The structure of ribosomal protein S7 at 1.9 Å resolution reveals a beta-hairpin motif that binds double-stranded nucleic acids. *Structure* **5**, 1187-1198 (1997).
32. E. V. Bocharov, A. T. Gudkov, E. V. Budovskaya, A. S. Arseniev, Conformational independence of N- and C-domains in ribosomal protein L7/L12 and in the complex with protein L10. *FEBS Lett* **423**, 347-350 (1998).
33. R. K. Agrawal *et al.*, Direct visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the Escherichia coli ribosome. *Science* **271**, 1000-1002 (1996).
34. D. I. Svergun *et al.*, Solution scattering structural analysis of the 70 S Escherichia coli ribosome by contrast variation. I. Invariants and validation of electron microscopy models. *J Mol Biol* **271**, 588-601 (1997).
35. R. Green, H. F. Noller, Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **66**, 679-716 (1997).
36. B. L. Golden, D. W. Hoffman, V. Ramakrishnan, S. W. White, Ribosomal protein S17: characterization of the three-dimensional structure by 1H and 15N NMR. *Biochemistry* **32**, 12812-12820 (1993).
37. E. V. Bocharov *et al.*, From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J Biol Chem* **279**, 17697-17706 (2004).
38. J. H. Kim, A. G. Marshall, Dynamic structure of bacterial ribosomal 5S RNA helices II and III of B. megaterium 5S RNA. *Biochem Biophys Res Commun* **169**, 1068-1074 (1990).
39. C. C. Correll *et al.*, Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13436-13441 (1998).
40. A. Munishkin, I. G. Wool, The ribosome-in-pieces: binding of elongation factor EF-G to oligoribonucleotides that mimic the sarcin/ricin and

- thiostrepton domains of 23S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12280-12284 (1997).
41. V. D. Vasiliev, O. M. Selivanova, V. I. Baranov, A. S. Spirin, Structural study of translating 70 S ribosomes from *Escherichia coli*. I. Electron microscopy. *FEBS Lett* **155**, 167-172 (1983).
 42. J. A. Lake, M. Pendergast, L. Kahan, M. Nomura, Localization of *Escherichia coli* ribosomal proteins S4 and S14 by electron microscopy of antibody-labeled subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4688-4692 (1974).
 43. G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt, G. Stoffler, Architecture of the *Escherichia coli* ribosome as determined by immune electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4820-4824 (1975).
 44. I. N. Shatsky, L. V. Mochalova, M. S. Kojouharova, A. A. Bogdanov, V. D. Vasiliev, Localization of the 3' end of *Escherichia coli* 16 S RNA by electron microscopy of antibody-labelled subunits. *J Mol Biol* **133**, 501-515 (1979).
 45. A. G. Evstafieva, I. N. Shatsky, A. A. Bogdanov, Y. P. Semenov, V. D. Vasiliev, Localization of 5' and 3' ends of the ribosome-bound segment of template polynucleotides by immune electron microscopy. *EMBO J* **2**, 799-804 (1983).
 46. I. N. Shatsky, A. G. Evstafieva, T. F. Bystrova, A. A. Bogdanov, V. D. Vasiliev, Topography of RNA in the ribosome: location of the 3'-end of 5 S RNA on the central protuberance of the 50 S subunit. *FEBS Lett* **121**, 97-100 (1980).
 47. I. N. Shatsky, A. G. Evstafieva, T. F. Bystrova, A. A. Bogdanov, V. D. Vasiliev, Topography of RNA in the ribosome: localization of the 3'-end of the 23 S rna on the surface of the 50 S ribosomal subunit by immune electron microscopy. *FEBS Lett* **122**, 251-255 (1980).

48. I. N. Shatsky, A. V. Bakin, A. A. Bogdanov, V. D. Vasiliev, How does the mRNA pass through the ribosome? *Biochimie* **73**, 937-945 (1991).
49. J. Frank, Image analysis of single macromolecules. *Electron Microsc Rev* **2**, 53-74 (1989).
50. J. Frank, Electron microscopy of functional ribosome complexes. *Biopolymers* **68**, 223-233 (2003).
51. P. Sergiev *et al.*, Correlating the X-ray structures for halo- and thermophilic ribosomal subunits with biochemical data for the Escherichia coli ribosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**, 87-100 (2001).
52. D. Graifer, G. Karpova, Interaction of tRNA with eukaryotic ribosome. *Int J Mol Sci* **16**, 7173-7194 (2015).
53. D. Graifer, G. Karpova, Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes. *Biochimie* **109**, 1-17 (2015).
54. A. S. Spirin, I. N. Serdyuk, J. L. Shpungin, V. D. Vasiliev, Quaternary structure of the ribosomal 30S subunit: model and its experimental testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4867-4871 (1979).
55. S. Stern, T. Powers, L. M. Changchien, H. F. Noller, RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunits: folding and function of 16S rRNA. *Science* **244**, 783-790 (1989).
56. R. Brimacombe, RNA-protein interactions in the Escherichia coli ribosome. *Biochimie* **73**, 927-936 (1991).
57. P. B. Moore *et al.*, Neutron scattering and the 30 S ribosomal subunit of E. coli. *Basic Life Sci* **27**, 73-91 (1984).
58. M. S. Capel *et al.*, A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of Escherichia coli. *Science* **238**, 1403-1406 (1987).
59. V. D. Vasiliev, O. M. Selivanova, V. E. Koteliansky, Specific selfpacking of the ribosomal 16 S RNA. *FEBS Lett* **95**, 273-276 (1978).

60. V. D. Vasiliev, O. M. Zalite, Specific compact selfpacking of the ribosomal 23 S RNA. *FEBS Lett* **121**, 101-104 (1980).
61. C. R. Woese, R. Gutell, R. Gupta, H. F. Noller, Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol Rev* **47**, 621-669 (1983).
62. S. Stern, D. Moazed, H. F. Noller, Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension. *Methods Enzymol* **164**, 481-489 (1988).
63. T. Powers, H. F. Noller, A temperature-dependent conformational rearrangement in the ribosomal protein S4.16 S rRNA complex. *J Biol Chem* **270**, 1238-1242 (1995).
64. R. Brimacombe *et al.*, The three-dimensional structure and function of Escherichia coli ribosomal RNA, as studied by cross-linking techniques. *Biochim Biophys Acta* **1050**, 8-13 (1990).
65. J. R. Brimacombe, J. A. Caunt, Anaesthesia in a gravid achondroplastic dwarf. *Anaesthesia* **45**, 132-134 (1990).
66. H. F. Noller *et al.*, Structure and function of ribosomal RNA. *Biochem Cell Biol* **73**, 997-1009 (1995).
67. I. Makowski *et al.*, Single crystals of large ribosomal particles from Halobacterium marismortui diffract to 6 Å. *J Mol Biol* **193**, 819-822 (1987).
68. K. von Bohlen *et al.*, 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 (1991).
69. S. Trakhanov *et al.*, Preliminary X-ray investigation of 70 S ribosome crystals from Thermus thermophilus. *J Mol Biol* **209**, 327-328 (1989).
70. G. Yusupova *et al.*, Formation and crystallization of Thermus thermophilus 70S ribosome/tRNA complexes. *FEBS Lett* **290**, 69-72 (1991).

71. F. Schluenzen *et al.*, Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**, 615-623 (2000).
72. R. K. Flygaard, N. Boegholm, M. Yusupov, L. B. Jenner, Cryo-EM structure of the hibernating *Thermus thermophilus* 100S ribosome reveals a protein-mediated dimerization mechanism. *Nat Commun* **9**, 4179 (2018).
73. A. Rozov *et al.*, Importance of potassium ions for ribosome structure and function revealed by long-wavelength X-ray diffraction. *Nat Commun* **10**, 2519 (2019).
74. T. Hussain, J. L. Llacer, B. T. Wimberly, J. S. Kieft, V. Ramakrishnan, Large-Scale Movements of IF3 and tRNA during Bacterial Translation Initiation. *Cell* **167**, 133-144 e113 (2016).
75. M. Selmer *et al.*, Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**, 1935-1942 (2006).
76. B. S. Schuwirth *et al.*, Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**, 827-834 (2005).
77. M. Harel *et al.*, Crystallization of halophilic malate dehydrogenase from *Halobacterium marismortui*. *J Mol Biol* **200**, 609-610 (1988).
78. N. Ban *et al.*, A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* **93**, 1105-1115 (1998).
79. P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920-930 (2000).
80. J. M. Ogle *et al.*, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897-902 (2001).
81. D. Moazed, H. F. Noller, Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in 16 S rRNA. *J Mol Biol* **211**, 135-145 (1990).

82. L. B. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova, M. Yusupov, Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 555-560 (2010).
83. L. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova, M. Yusupov, Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1072-1078 (2010).
84. A. Rozov, N. Demeshkina, E. Westhof, M. Yusupov, G. Yusupova, New Structural Insights into Translational Miscoding. *Trends Biochem Sci* **41**, 798-814 (2016).
85. A. S. Spirin, A model of the functioning ribosome: locking and unlocking of the ribosome subparticles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **34**, 197-207 (1969).
86. J. A. Dunkle *et al.*, Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. *Science* **332**, 981-984 (2011).
87. A. H. Ratje *et al.*, Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature* **468**, 713-716 (2010).
88. D. J. Ramrath *et al.*, Visualization of two transfer RNAs trapped in transit during elongation factor G-mediated translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20964-20969 (2013).
89. M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, V. I. Katunin, W. Wintermeyer, Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* **385**, 37-41 (1997).
90. D. Moazed, H. F. Noller, Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**, 142-148 (1989).
91. J. Frank, R. K. Agrawal, A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**, 318-322 (2000).

92. J. M. Ogle, V. Ramakrishnan, Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* **74**, 129-177 (2005).
93. M. Simonovic, T. A. Steitz, A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 612-623 (2009).
94. R. T. Garvin, D. K. Biswas, L. Gorini, The effects of streptomycin or dihydrostreptomycin binding to 16S RNA or to 30S ribosomal subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3814-3818 (1974).
95. A. P. Carter *et al.*, Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348 (2000).
96. D. E. Brodersen *et al.*, The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**, 1143-1154 (2000).
97. J. M. Ogle, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* **28**, 259-266 (2003).
98. M. Pioletti *et al.*, Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J* **20**, 1829-1839 (2001).
99. L. Jenner *et al.*, Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3812-3816 (2013).
100. N. Ban, [What is expected in instructors of clinical internal medicine. 2. History taking and physical examination: latest educational technology]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi* **87**, 1827-1832 (1998).
101. M. G. Rossmann, Ab initio phase determination and phase extension using non-crystallographic symmetry. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 650-655 (1995).

102. M. P. Ashe, S. K. De Long, A. B. Sachs, Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol Biol Cell* **11**, 833-848 (2000).
103. B. Lang *et al.*, A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal Biochem* **77**, 110-121 (1977).
104. A. J. McCoy *et al.*, Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
105. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
106. G. J. Kleywegt, T. A. Jones, Template convolution to enhance or detect structural features in macromolecular electron-density maps. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 179-185 (1997).
107. A. Vagin, A. Teplyakov, A translation-function approach for heavy-atom location in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 400-402 (1998).
108. A. Ben-Shem, L. Jenner, G. Yusupova, M. Yusupov, Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* **330**, 1203-1209 (2010).
109. R. A. Milligan, P. N. Unwin, In vitro crystallization of ribosomes from chick embryos. *J Cell Biol* **95**, 648-653 (1982).
110. B. P. Klaholz, A. G. Myasnikov, M. Van Heel, Visualization of release factor 3 on the ribosome during termination of protein synthesis. *Nature* **427**, 862-865 (2004).
111. W. M. Clemons, Jr. *et al.*, Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: purification, crystallization and structure determination. *J Mol Biol* **310**, 827-843 (2001).
112. A. Ben-Shem *et al.*, The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524-1529 (2011).

113. B. Heras, J. L. Martin, Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1173-1180 (2005).
114. C. Rajendran, F. S. Dworkowski, M. Wang, C. Schulze-Briese, Radiation damage in room-temperature data acquisition with the PILATUS 6M pixel detector. *J Synchrotron Radiat* **18**, 318-328 (2011).
115. M. Mueller, M. Wang, C. Schulze-Briese, Optimal fine phi-slicing for single-photon-counting pixel detectors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 42-56 (2012).
116. C. M. Spahn *et al.*, Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**, 373-386 (2001).
117. T. F. Smith, J. C. Lee, R. R. Gutell, H. Hartman, The origin and evolution of the ribosome. *Biol Direct* **3**, 16 (2008).
118. H. Khatter, A. G. Myasnikov, S. K. Natchiar, B. P. Klaholz, Structure of the human 80S ribosome. *Nature* **520**, 640-645 (2015).
119. J. P. Armache *et al.*, Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19748-19753 (2010).
120. J. P. Armache *et al.*, Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19754-19759 (2010).
121. D. J. Klein, P. B. Moore, T. A. Steitz, The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **340**, 141-177 (2004).

122. Y. Timsit, Z. Acosta, F. Allemand, C. Chiaruttini, M. Springer, The role of disordered ribosomal protein extensions in the early steps of eubacterial 50 S ribosomal subunit assembly. *Int J Mol Sci* **10**, 817-834 (2009).
123. N. Demeshkina, L. Jenner, E. Westhof, M. Yusupov, G. Yusupova, A new understanding of the decoding principle on the ribosome. *Nature* **484**, 256-259 (2012).
124. D. N. Wilson, J. H. Doudna Cate, The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
125. N. Sonenberg, A. G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745 (2009).
126. R. J. Jackson, C. U. Hellen, T. V. Pestova, The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-127 (2010).
127. C. M. Spahn *et al.*, Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J* **23**, 1008-1019 (2004).
128. H. S. Park, A. Himmelbach, K. S. Browning, T. Hohn, L. A. Ryabova, A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. *Cell* **106**, 723-733 (2001).
129. N. Van Dyke, J. Baby, M. W. Van Dyke, Stm1p, a ribosome-associated protein, is important for protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under nutritional stress conditions. *J Mol Biol* **358**, 1023-1031 (2006).
130. V. Balagopal, R. Parker, Stm1 modulates translation after 80S formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **17**, 835-842 (2011).
131. A. Vila-Sanjurjo, B. S. Schuwirth, C. W. Hau, J. H. Cate, Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1054-1059 (2004).

132. M. R. Sharma *et al.*, PSRP1 is not a ribosomal protein, but a ribosome-binding factor that is recycled by the ribosome-recycling factor (RRF) and elongation factor G (EF-G). *J Biol Chem* **285**, 4006-4014 (2010).
133. D. N. Wilson, The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**, 393-433 (2009).
134. T. Schneider-Poetsch *et al.*, Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* **6**, 209-217 (2010).
135. L. Bidou, V. Allamand, J. P. Rousset, O. Namy, Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends Mol Med* **18**, 679-688 (2012).
136. T. Kataoka, Translation inhibitors and their unique biological properties. *Eur J Pharmacol* **676**, 1-5 (2012).
137. K. Nikolouli, D. Mossialos, Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnol Lett* **34**, 1393-1403 (2012).
138. Y. Muthukumar, M. Roy, A. Raja, R. E. Taylor, F. Sasse, The marine polyketide myriaporone 3/4 stalls translation by targeting the elongation phase. *Chembiochem* **14**, 260-264 (2013).
139. R. E. Taylor, Tedanolide and the evolution of polyketide inhibitors of eukaryotic protein synthesis. *Nat Prod Rep* **25**, 854-861 (2008).
140. S. R. Rajski, B. Shen, Multifaceted modes of action for the glutarimide-containing polyketides revealed. *Chembiochem* **11**, 1951-1954 (2010).
141. W. Stocklein, W. Piepersberg, Binding of cycloheximide to ribosomes from wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **18**, 863-867 (1980).

142. W. Stocklein, W. Piepersberg, Altered ribosomal protein L29 in a cycloheximide-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **1**, 177-183 (1980).
143. T. G. Obrig, W. J. Culp, W. L. McKeehan, B. Hardesty, The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* **246**, 174-181 (1971).
144. S. Lee *et al.*, Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2424-2432 (2012).
145. S. J. Schroeder, G. Blaha, J. Tirado-Rives, T. A. Steitz, P. B. Moore, The structures of antibiotics bound to the E site region of the 50 S ribosomal subunit of *Haloarcula marismortui*: 13-deoxytedanolide and girodazole. *J Mol Biol* **367**, 1471-1479 (2007).
146. G. Gurel, G. Blaha, T. A. Steitz, P. B. Moore, Structures of triacetyloleandomycin and mycalamide A bind to the large ribosomal subunit of *Haloarcula marismortui*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5010-5014 (2009).
147. S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus, N. Ban, Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* **334**, 941-948 (2011).
148. N. Garreau de Loubresse *et al.*, Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome. *Nature* **513**, 517-522 (2014).
149. N. T. Ingolia, S. Ghaemmaghami, J. R. Newman, J. S. Weissman, Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218-223 (2009).
150. Y. Chen, S. Li, Omacetaxine mepesuccinate in the treatment of intractable chronic myeloid leukemia. *Onco Targets Ther* **7**, 177-186 (2014).

151. A. Evidente *et al.*, Biological evaluation of structurally diverse amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Med* **75**, 501-507 (2009).
152. S. P. McCormick, A. M. Stanley, N. A. Stover, N. J. Alexander, Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)* **3**, 802-814 (2011).
153. W. A. Decatur, M. J. Fournier, rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci* **27**, 344-351 (2002).
154. J. Chan, S. N. Khan, I. Harvey, W. Merrick, J. Pelletier, Eukaryotic protein synthesis inhibitors identified by comparison of cytotoxicity profiles. *RNA* **10**, 528-543 (2004).
155. N. F. Kaufer, H. M. Fried, W. F. Schwindinger, M. Jasin, J. R. Warner, Cycloheximide resistance in yeast: the gene and its protein. *Nucleic Acids Res* **11**, 3123-3135 (1983).
156. E. Svidritskiy, C. Ling, D. N. Ermolenko, A. A. Korostelev, Blasticidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12283-12288 (2013).
157. R. A. Shank, N. A. Foroud, P. Hazendonk, F. Eudes, B. A. Blackwell, Current and future experimental strategies for structural analysis of trichothecene mycotoxins--a prospectus. *Toxins (Basel)* **3**, 1518-1553 (2011).
158. A. Jimenez, L. Sanchez, D. Vazquez, Simultaneous ribosomal resistance to trichodermin and anisomycin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Biochim Biophys Acta* **383**, 427-434 (1975).
159. D. Schindler, Two classes of inhibitors of peptidyl transferase activity in eukaryotes. *Nature* **249**, 38-41 (1974).
160. D. Schindler, P. Grant, J. Davies, Trichodermin resistance--mutation affecting eukaryotic ribosomes. *Nature* **248**, 535-536 (1974).

161. H. M. Fried, J. R. Warner, Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 238-242 (1981).
162. J. L. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **330**, 1061-1075 (2003).
163. A. Meskauskas, A. N. Petrov, J. D. Dinman, Identification of functionally important amino acids of ribosomal protein L3 by saturation mutagenesis. *Mol Cell Biol* **25**, 10863-10874 (2005).
164. J. M. Ogle, F. V. Murphy, M. J. Tarry, V. Ramakrishnan, Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**, 721-732 (2002).
165. E. Shulman *et al.*, Designer aminoglycosides that selectively inhibit cytoplasmic rather than mitochondrial ribosomes show decreased ototoxicity: a strategy for the treatment of genetic diseases. *J Biol Chem* **289**, 2318-2330 (2014).
166. H. Fan-Minogue, D. M. Bedwell, Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity. *RNA* **14**, 148-157 (2008).
167. M. I. Recht, S. Douthwaite, J. D. Puglisi, Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* **18**, 3133-3138 (1999).
168. B. Becker, M. A. Cooper, Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol* **8**, 105-115 (2013).
169. D. Perez-Fernandez *et al.*, 4'-O-substitutions determine selectivity of aminoglycoside antibiotics. *Nat Commun* **5**, 3112 (2014).
170. G. Dinos *et al.*, Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: the universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding. *Mol Cell* **13**, 113-124 (2004).

171. M. Kozak, A. J. Shatkin, Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of edeine. *J Biol Chem* **253**, 6568-6577 (1978).
172. H. Dolz, D. Vazquez, A. Jimenez, Quantitation of the specific interaction of [14a-3H]cryptopleurine with 80S and 40S ribosomal species from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **21**, 3181-3187 (1982).
173. L. Sanchez, D. Vasquez, A. Jimenez, Genetics and biochemistry of cryptopleurine resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **156**, 319-326 (1977).
174. S. N. Hobbie *et al.*, Genetic reconstruction of protozoan rRNA decoding sites provides a rationale for paromomycin activity against *Leishmania* and *Trypanosoma*. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1161 (2011).
175. W. Lu, N. Roongsawang, T. Mahmud, Biosynthetic studies and genetic engineering of pactamycin analogs with improved selectivity toward malarial parasites. *Chem Biol* **18**, 425-431 (2011).
176. J. C. Darnell, E. Klann, The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. *Nat Neurosci* **16**, 1530-1536 (2013).
177. Y. Mamane *et al.*, eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* **23**, 3172-3179 (2004).
178. S. D. Heys *et al.*, Measurement of tumour protein synthesis in vivo in human colorectal and breast cancer and its variability in separate biopsies from the same tumour. *Clin Sci (Lond)* **80**, 587-593 (1991).
179. A. Malina, J. R. Mills, J. Pelletier, Emerging therapeutics targeting mRNA translation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a012377 (2012).
180. V. Gandhi, W. Plunkett, J. E. Cortes, Omacetaxine: a protein translation inhibitor for treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* **20**, 1735-1740 (2014).

181. C. Malochet-Grivois *et al.*, Effects in vitro of two marine substances, chlorolissoclimide and dichlorolissoclimide, on a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). *Anticancer Drug Des* **7**, 493-502 (1992).
182. V. Ferey, P. Vedrenne, L. Toupet, T. Le Gall, C. Mioskowski, Asymmetric Synthesis of alpha-Alkylproline Derivatives from a Chiral Borane-Amine Adduct: Inversion of Enantioselectivity in the Presence of a Crown Ether. *J Org Chem* **61**, 7244-7245 (1996).
183. F. Robert *et al.*, Chlorolissoclimides: new inhibitors of eukaryotic protein synthesis. *RNA* **12**, 717-725 (2006).
184. Y. N. Imai, Y. Inoue, I. Nakanishi, K. Kitaura, Cl-pi interactions in protein-ligand complexes. *Protein Sci* **17**, 1129-1137 (2008).
185. G. M. Cragg, P. G. Grothaus, D. J. Newman, Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* **109**, 3012-3043 (2009).
186. D. J. Newman, G. M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* **79**, 629-661 (2016).
187. S. Han, D. S. Siegel, K. C. Morrison, P. J. Hergenrother, M. Movassaghi, Synthesis and anticancer activity of all known (-)-agelastatin alkaloids. *J Org Chem* **78**, 11970-11984 (2013).
188. G. R. Pettit *et al.*, Antineoplastic agents 470. Absolute configuration of the marine sponge bromopyrrole agelastatin A. *Oncol Res* **15**, 11-20 (2005).
189. G. R. Pettit *et al.*, Antineoplastic agents. 595. Structural modifications of betulin and the X-ray crystal structure of an unusual betulin amine dimer. *J Nat Prod* **77**, 863-872 (2014).
190. A. Jimenez, A. Santos, G. Alonso, D. Vazquez, Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some amaryllidaceae alkaloids. *Biochim Biophys Acta* **425**, 342-348 (1976).

191. S. Pellegrino *et al.*, The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure* **26**, 416-425 e414 (2018).
192. Y. S. Polikanov *et al.*, Amicoumacin a inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome. *Mol Cell* **56**, 531-540 (2014).
193. L. Frolova *et al.*, A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* **372**, 701-703 (1994).
194. I. Stansfield, K. M. Jones, M. F. Tuite, The end in sight: terminating translation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **20**, 489-491 (1995).
195. L. Frolova, A. Seit-Nebi, L. Kisselev, Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1. *RNA* **8**, 129-136 (2002).
196. L. V. Zingman, S. Park, T. M. Olson, A. E. Alekseev, A. Terzic, Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy. *Clin Pharmacol Ther* **81**, 99-103 (2007).
197. I. Prokhorova *et al.*, Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E10899-E10908 (2017).