

## РИБСОМА КАК АЛЛОСТЕРИЧЕСКИ УПРАВЛЯЕМАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАШИНА

©2017 г. Т. М. МАКАРОВА И А. А. БОГДАНОВ

*Научно-исследовательский институт физико-химической  
биологии имени А.Н.Белозерского и Химический факультет  
МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Аллостерические эффекты, наблюдаемые при взаимодействии рибосомы с тРНК. III. Аллостерическая регуляция пептидилтрансферазного центра рибосомы. IV. Аллостерические эффекты, сопровождающие процесс транслокации. V. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Рибосома представляет собой молекулярную машину, которая синтезирует все клеточные белки, декодируя информацию, записанную в нуклеотидной последовательности матричных РНК (мРНК). Рибосома – огромный РНК-белковый комплекс: только у бактерий она содержит три молекулы рибосомных РНК (рРНК), общей длиной более 5 тыс. нуклеотидных остатков, более пятидесяти рибосомных белков, а также, в каждый момент ее работы, вспомогательные белковые факторы. Рибосома синтезирует белковые цепи из активированных аминокислот, переносимых в ее пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) транспортными РНК (тРНК). Для этой задачи рибосома должна просканировать мРНК, отобрать аминоацил-тРНК (aa-тРНК)

---

*Принятые сокращения:* РТ – рибосомный туннель, ПТЦ – пептидилтрансферазный центр рибосомы, ДЦ – декодирующий центр рибосомы, SRL – сарцин-рициновая петля, или спираль 95 рибосомы, GAC – связанный с ГТФазами центр рибосомы, FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии, smFRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии отдельных молекул.

*Адрес для корреспонденции:* bogdanov@belozersky.msu.ru

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда: проекты 15-04-00006 (разделы, посвященные аллостерическим эффектам, сопровождающим процесс транслокации) и 14-24-00061-П (разделы, посвященные аллостерическим эффектам, наблюдаемым при взаимодействии рибосомы с тРНК), и Российского фонда фундаментальных исследований: проект 16-04-00709-а (раздел, посвященный регуляции пептидилтрансферазного центра рибосомы).

с антикодоном, комплементарным кодону в мРНК, правильным образом расположить субстраты реакции пептидного синтеза в ПТЦ и тем самым катализировать реакцию транспептидации, а затем осуществить согласованное перемещение (транслокацию) тРНК и мРНК на один кодон, чтобы освободить место для новой аа-тРНК (рис. 1, А). При этом на каждой стадии этого многоэтапного процесса изменяется конформация не только рибосомы, но и ее лигандов, тРНК и белковых факторов трансляции (для обзоров см. [1, 2]). В литературе накоплено большое количество разрозненных данных, которые говорят о том, что сигналы, управляющие этими структурными превращениями, передаются аллостерически. В настоящей обзорной статье мы, насколько нам известно, впервые делаем попытку систематизировать факты, доказывающие существование аллостерии в рибосоме. Аллостерические свойства обнаружены у рибосом всех живых организмов, что не удивительно, если иметь в виду их исключительно высокую консервативность в ходе биологической эволюции. Однако, на сегодня в литературе достаточно хорошо документированные сведения об аллостерии аппарата трансляции можно найти лишь для рибосом бактерий и дрожжей. Поэтому в настоящей обзорной статье анализируются данные, полученные для только для этих микроорганизмов.

Термины «аллостерия» и «аллостерический» впервые появились, когда было установлено, что активность белков может активироваться или ингибироваться факторами, чей сайт связывания с белковой молекулой сильно удален от ее функционального центра и с ним не перекрывается [3]. Эти термины происходят от греческого слова «аллос», «другой». Позже стало понятно, что аллостерические явления относятся к фундаментальным свойствам живой материи – ее восприимчивости и изменчивости, ее способности принимать, передавать и запоминать информацию, заключенную в конформационном состоянии макромолекул. Аллостерически управляется и регулируется активность многих белков и ферментов (например, [4]), а также различные этапы экспрессии генов [5, 6], лиганд-рецепторные взаимодействия, работа ионных каналов [7], и многие другие процессы. Это явление было обнаружено не только в белковых молекулах, но и как в ДНК-белковых комплексах [8, 9], так и в РНК, начиная от небольших аптамеров [10] и до, как это уже отмечалось, крупнейшей РНК-белковой структуры в клетке, рибосомы.

Аллостерическая регуляция возможна благодаря, во-первых, гибкой и подвижной структуре биологических макромолекул, во-вторых,

конформационной связности их остатков: кооперативная подвижность обеспечивает несколько разрешенных состояний биомолекулы около глобального минимума, между которыми возможно переключение во времени. В простейшей модели таких состояний два, и они обозначаются как R, relaxed, релаксированное и T, tense, напряженное, которые в свободном состоянии находятся в равновесии между собой, а привнесенный в систему аллостерический эффектор способен это равновесие сместить, благодаря предпочтительному сродству к одному из этих состояний. Аллостерические эффекторы – это, как правило, низкомолекулярные лиганды, однако, примерно с 1990-х годов к ним стали относить точечные мутации и модификации, смену общих условий, таких, как pH среды или ионная сила. Если при смене состояний белка геометрия активного или связывающего другой лиганд центра переключается через порог, отделяющий активное от неактивного состояния, то наблюдается аллостерическая регуляция этой активности [11].

Первые математические модели, описывающие аллостерические эффекты, были построены для объяснения кооперативных эффектов во многосубъединичных белках, хрестоматийный пример которых – эффект Бора (Bohr effect), или кооперативное связывание кислорода четырьмя субъединицами гемоглобина. Самая ранняя, т.н. согласованная модель (concerted model), или MWC по аббревиатуре фамилий авторов (Monod-Wyman-Changeux) [12] рассматривает многосубъединичный белок как неделимый аллостерический переключатель, так, что все его субъединицы переключаются из активного в неактивное состояние одновременно и полностью согласованно, откуда и название модели. Опубликованная чуть позже т.н. последовательная модель (sequential model), обозначаемая аббревиатурой KNF также по фамилиям авторов (Koshland-Némethy-Filmer) [13], допускает возможность для разных субъединиц одного белка быть в разных состояниях, однако, изменение конформации одной из них вызывает смещение равновесия для каждой последующей. Эта модель, в отличие от MWC, позволяет описать не только положительную, но и отрицательную кооперативность, найденную, например, у аденозинтрифосфатаз многосубъединичного бактериального шаперона GroEL [14].

Сравнительно недавно была разработана термодинамическая ансамблевая аллостерическая модель (ensemble allosteric model, EAM) [15], наследующая подходам 60-х годов XX века, но уже позволяющая объяснить более сложные феномены вплоть до смены знака аллостерического эффекта лиганда в зависимости от условий.

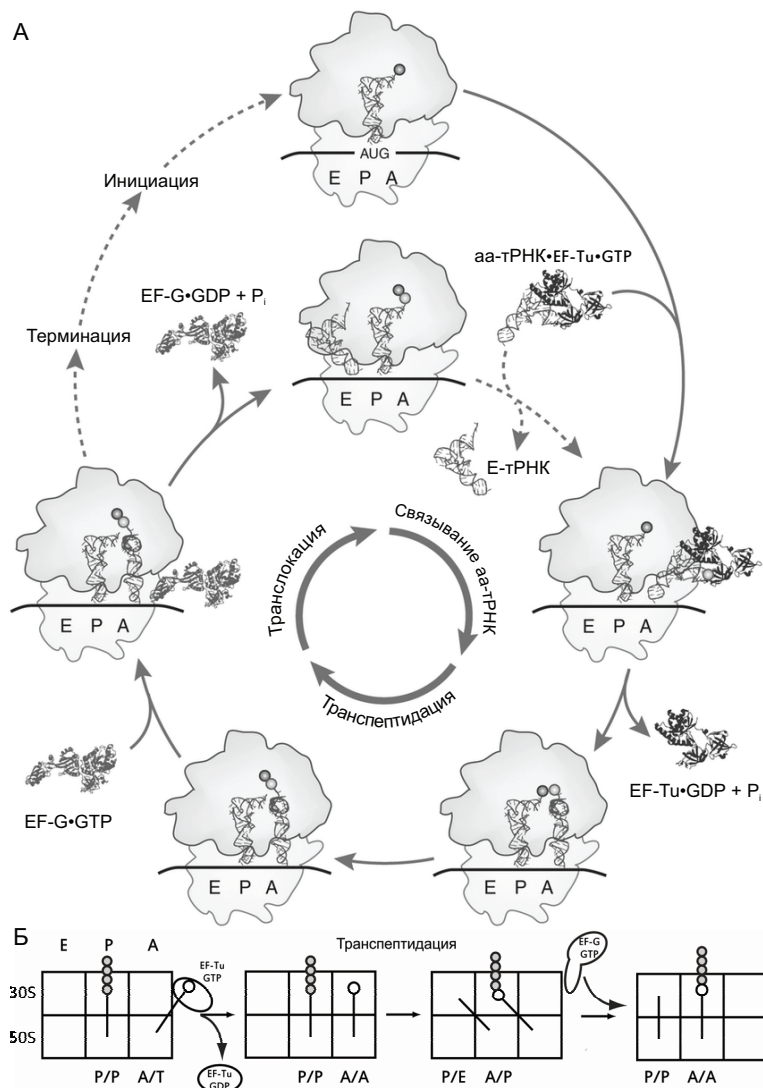


Рис. 1 **А.** Цикл работы рибосомы. Три основных этапа элонгации подписаны во внутреннем круге; факторы элонгации, задействованные в цикле, подписаны в составе комплексов, как входящих во взаимодействие с рибосомой, так и диссоциировавших после завершения стадии. Инициация синтеза новой пептидной цепи, равно как и терминация трансляции на стоп-кодоне подписаны во внешнем цикле. Адаптировано из [92]. **Б.** Последовательное продвижение тРНК по сайтам рибосомы во время элонгации. Сайты, занимаемые тРНК, подписаны снизу, субъединицы рибосомы – слева от рисунка; вновь синтезированная полипептидная цепь обозначена закрашенными кружками, новая аминокислота – незакрашенным.

Такое явление наблюдается, в частности, в случае некоторых транскрипционных факторов, способных быть агонистами или антагонистами при смене условий [16, 17]. В этой модели белок подразделяется на условные «домены» (подобно субъединицам в моделях-предшественницах), связывающие два лиганда А и В, у которых есть свои Т и R состояния, а изменение свободной энергии при переходе между состояниями складывается из изменения энергии состояний самих доменов плюс изменения энергии междоменного взаимодействия. В целом, новая термодинамическая модель позволяет учесть намного больше состояний, чем модели 60-х годов (рис. 2).

Вышеупомянутые модели предполагают лишь «четвертичный» уровень изменений в белке через переключение состояний субъединиц, оставляя «третичный» уровень, уровень конкретных межмолекулярных связей и конформаций отдельных остатков, черным ящиком, лишь задающим то или иное состояние субъединицы. Между тем, «третичный» уровень может самостоятельно обеспечить обмен информацией в односубъединичных белках, и, предположительно, делает аллостерию универсальным свойством всех белков за исключением фибриллярных [18]. На этом уровне для многих систем были выделены конкретные пути (pathway) распространения сигнала и сети (networks) взаимодействий, с применением как вычислительных подходов [19], так и экспериментальных, фиксирующих изменения конформаций в ЯМР-релаксации [20]. При этом общая картина взаимодействия удаленных функциональных участков белков часто подразумевает множество взаимопереплетенных путей, организованных в глобальную сеть взаимодействий (global communication networks, GCN), а также взаимодействие между «четвертичным» и «третичным» уровнями, охватывая, таким образом, все единое целое молекулы [21].

Аллостерические состояния могут отличаться не только равновесным положением атомов, но и степенью подвижности в колебательных и вращательных модах, иначе говоря, конформационной энтропией [22]. Такая возможность была теоретически предсказана еще в 1984 г. и получила название «аллостерия без конформационных изменений» [23]. Наличие энтропийной составляющей делает традиционные структурные методы недостаточными для изучения аллостерии. Простейшая оценка диапазона колебаний главных мод, сделанная на основании величин В-факторов, извлеченных из структурных данных для избыточной выборки из 91 белка в комплексе с лигандами и без, обнаружила значительное изменение примерно у половины проанализированных структур. Таким образом, в этих белках энтропийный фактор немаловажен для аллостерических переключений [24].

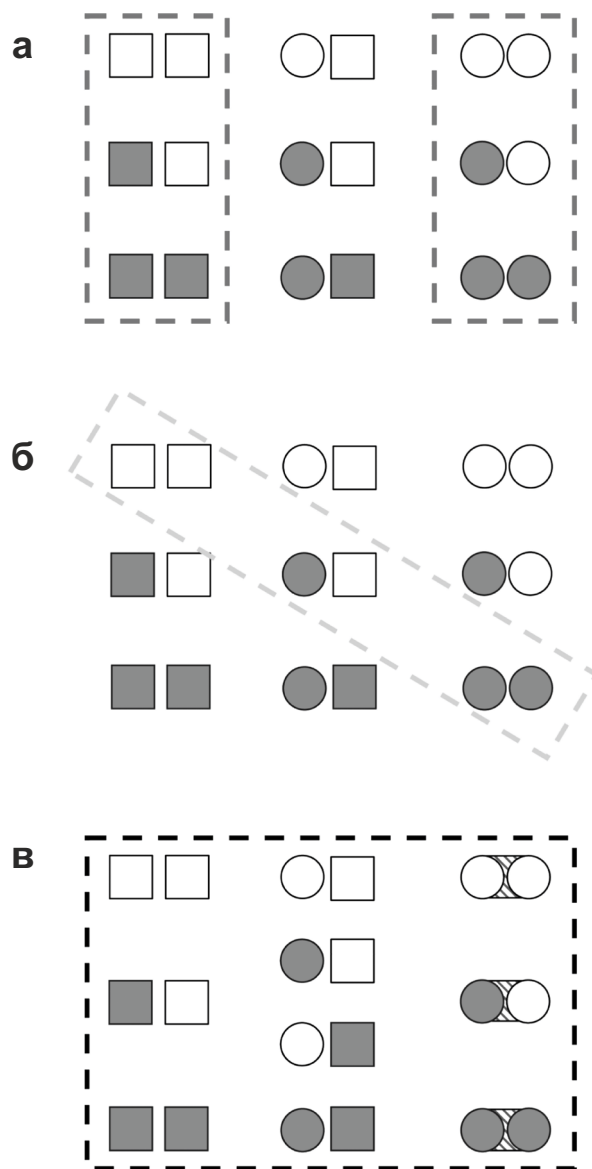


Рис. 2. Схематическое изображение рассматриваемых в разных термодинамических моделях состояний отдельных субъединиц для многосубъединичного белка. Здесь квадрат обозначает Т (напряженное) состояние, круг – R (релаксированное); закрашенная фигура означает домен, связавший лиганд, белая – незанятый лигандом. **а** – модель MWC (согласованная), **б** – KNF (последовательная), **в** – EAM (энергетических ансамблей). Адаптировано из [15].

Обобщая сказанное выше, отметим, что биологические макромолекулы имеют более одного разрешенного состояния около глобального минимума, и эти состояния различаются между собой конформационными и энтропийными характеристиками. Переключение макромолекулы между этими состояниями происходит целостным образом, так, что появляется возможность регулировать функционально важную область путем воздействия на удаленные сайты, стабилизируя то или иное состояние малым по размеру в масштабах данной биомолекулы лигандом-эффектором, а также мутацией или модификацией ее мономерных звеньев.

## **II. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ, НАБЛЮДАЕМЫЕ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ РИБОСОМЫ С тРНК**

### **СВЯЗЫВАНИЕ тРНК В А-САЙТЕ РИБОСОМЫ**

Как видно из рис. 1, тРНК, ацилированная аминокислотным остатком, последовательно сменяет в рибосоме три сайта связывания, которые носят названия А(acyl)-, Р(peptidyl)- и Е(exit)-сайтов. Рибосома состоит из двух субъединиц, большой и малой; субъединицы рибосомы имеют по три специфических участка, соответствующих каждому из этих сайтов. В ходе трансляции тРНК могут одновременно занимать не только оба участка одного и того же сайта на малой и большой субъединицах, но и находиться в одном из т.н. гибридных состояний, т.е. быть связанными с участками, принадлежащими разным сайтам (рис. 1, Б). Аминоацил-тРНК транспортируется в рибосому в составе тройного комплекса с элонгационным фактором EF-Tu (у бактерий), связанного с ГТФ (aa-тРНК•EF-Tu•ГТФ комплекс); она занимает А-сайтовый участок малой субъединицы, а на большой субъединице вместе с EF-Tu-ГТФ связывается с ее L7/L12-протуберанцем, что обозначается как гибридное А/Т-состояние aa-тРНК. Правильная геометрия кодон-антикоднового комплекса при взаимодействии антикодона этой тРНК со своим кодоном в мРНК стимулирует ГТФазную активность EF-Tu и гидролиз ГТФ, после чего тройной комплекс диссоциирует, а аминоацелированный ССА-конец этой тРНК занимает А-сайтовый участок большой субъединицы. Эта стадия цикла трансляции носит название аккомодации aa-тРНК. При этом Р-сайт рибосомы уже занят тРНК, ацилированной вновь синтезируемым пептидом (nascent peptide), или, если речь идет об инициации трансляции, остатком N-формилметионина. Взаимное расположение Е-, Р- и А/Т- тРНК, а также EF-Tu в комплексе с рибосомой изображено на рис. 3.

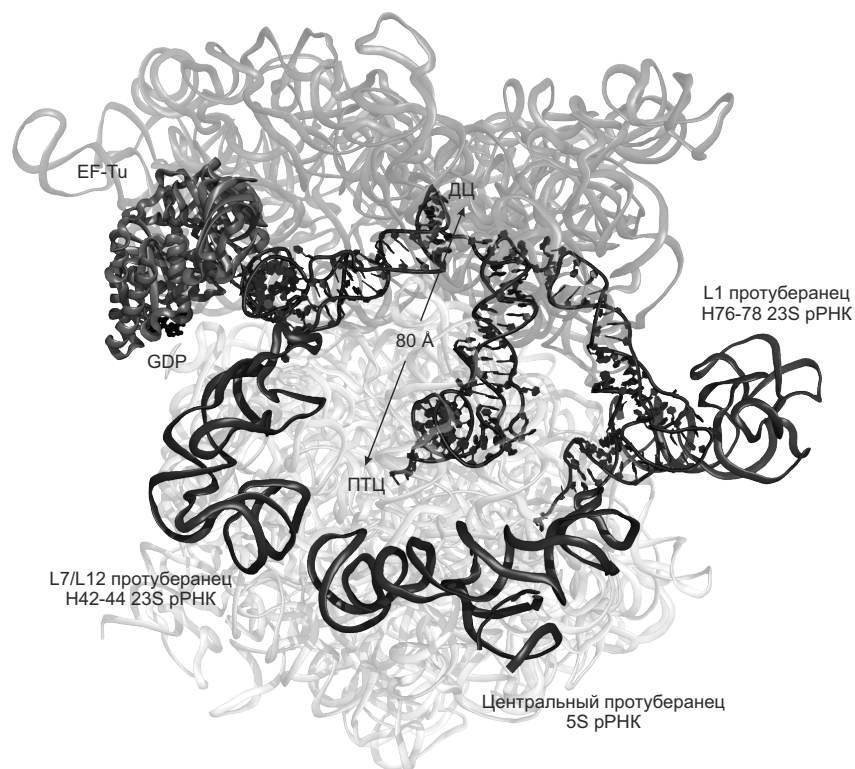


Рис. 3. Рибосома сразу после гидролиза ГТФ до ГДФ в процессе распознавания aa-тРНК. Изображена только рРНК в виде прозрачных лент и лиганды рибосомы: тРНК – в виде спиралей с лепестками, элонгационные факторы – в виде непрозрачных лент с ГДФ, отображенным черным. Темно-серыми непрозрачными лентами отображены рРНК протуберанцев большой субъединицы рибосомы. рРНК малой субъединицы (16S рРНК) отображена более темным оттенком серого, нежели рРНК большой субъединицы. тРНК связаны в сайтах (слева направо): А/Т, Р/Р, Е/Е. Показано расстояние в ангстремах между декодирующим центром (ДЦ) и пептидилтрансферазным центром (ПТЦ). Источник структуры – PDB id: 5AFI.

Оказалось, что связывание тРНК с рибосомой в А-сайте может быть нарушено удаленными мутациями, и, следовательно, оно зависит от конформации окружающих этот сайт элементов рибосомы.

Так, замена аденина в А2531, играющего важную роль в третичном контакте спиралей Н91 и Н95 в 23S рРНК, на пиримидиновые основания, заметно снижала сродство тройного комплекса (в котором роль aa-тРНК выполняла Phe-tRNA<sup>Phe</sup>) к рибосоме. При этом сродство



пептидил-тРНК к Р-сайту не изменялось. Расстояние от места упомянутой мутации до А-сайта большой субъединицы рибосомы составляет не менее 50 Å. [25].

Также связывание А-тРНК способна нарушить мутация, искажающая вторичную структуру спирали H89 посредством замены двух нуклеотидных остатков UU2492-3 на единственный остаток С [26].

Важно отметить, что в обоих случаях рибосома сохраняла функциональность, т. к. ряд стадий транслокации и сродство к Р-тРНК этими мутациями повреждены не были.

#### СУЩЕСТВУЕТ ЛИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ А- И Е-САЙТАМИ РИБОСОМЫ?

Тот факт, что связывание аа-тРНК в А-сайте может быть избирательно подавлено с помощью отдаленных точечных мутаций, косвенно свидетельствует в пользу его способности находится в двух состояниях – «открытом», способном к связыванию тРНК, и «закрытом», препятствующим этому связыванию. Имеет ли в таком случае переключение из одного состояния в другое какой-либо функциональный смысл? Может ли это переключение быть сенсором или, напротив, регулятором, координирующим связывание аа-тРНК в А-сайте с другими стадиями синтеза белка на рибосоме?

Казалось бы, достаточно определенный ответ на этот вопрос много лет назад был получен Ниерхаусом и сотр., которые обнаружили явление отрицательной кооперативности связывания тРНК в А- и Е-сайтах. [27–29]. Согласно данным этих авторов, аффинность деацилированной тРНК к Е-сайту, которая во многом определяется кодон-антикодоновыми взаимодействиями с мРНК, резко падала, когда аа-тРНК (например, Thr-tRNA<sup>Thr</sup>), занимала свой сайт. И наоборот, если создавались условия, способствующие связыванию деацилированной тРНК в Е-сайте рибосомы, А-сайт которой уже был занят аа-тРНК, комплекс последней с рибосомой разрушался. [28]

Впоследствии Ниерхаусом и сотр. были получены данные, предположительно свидетельствующие в пользу того, что аллостерическое взаимодействие тРНК в А- и Е-сайтах через мРНК, может поддерживать рамку считывания [30] и снижать частоту ошибок декодирования [31, 32]. Действительно, тРНК в Е-сайте с одной стороны препятствовала случайному сдвигу рамки считывания мРНК [33], с другой же содействовала ее сдвигу, если он был запрограммирован [34, 35]. Таким образом, можно было ожидать, что эти взаимодействия имеют прямое отношение к управлению перемещением мРНК в процессе транслокации.

Гипотеза Ниерхауса о взаимоисключающем связывании А- и Е-тРНК с рибосомой долгое время была предметом ожесточенных споров. Так, в лаборатории Родниной и Винтермайера было показано, что в бесклеточной системе при высокой концентрации ионов  $Mg^{2+}$  и полиаминов тройной комплекс с участием Phe-тРНК<sup>Phe</sup> не ускорял диссоциацию tRNA<sup>fMet</sup> из Е-сайта, прочно связанную с ним, благодаря введению в систему полиаминов [36].

Строго говоря, дискуссию вокруг гипотезы Ниерхауса еще нельзя считать законченной (для обзора см. [2]), тем более, что в литературе время от времени появляются данные, казалось бы, примиряющие две противоположные точки зрения. Так, при исследовании связывания и диссоциации тРНК в реальном времени на индивидуальных молекулах рибосом посредством smFRET, позволяющим проследить за несколькими начальными элонгационными циклами трансляции с разными последовательностями мРНК, было обнаружено, что конкуренция между А- и Е-сайтами рибосомы, по сути дела, зависит от длины синтезируемого пептида. Оставив в стороне детали, на основании результатов этой работы можно заключить, что механизм Ниерхауса срабатывал на самых первых этапах синтеза полипептида, а механизм Родниной-Винтермайера – на последующих [37]. Здесь также следует отметить, что рассмотренная выше дилемма может быть решена только при анализе системы с недиссоциированной на субъединицы рибосомой в присутствии мРНК и полноценных молекул тРНК, поскольку запрета на одновременное связывание ССА-фрагментов тРНК в А- и Е-сайте большой субъединицы нет, и занятость Е-сайта большой субъединицы никак не искажает геометрию связывания концевой фрагмента тРНК в А-сайте 50S субъединицы *H. marismortui* [38]. В пользу необходимости продолжить поиски решения этой проблемы говорит то, что сайт-направленным мутагенезом аллостерическая взаимосвязь А- и Е-сайтов установлена: мутация в А-сайте дрожжевой рибосомы C2820U (C2452 *E. coli*) увеличивает доступность к химической модификации двух аденинов (A2778 и A2779) в спирали H88 25S рРНК, расположенной в непосредственной окрестности Е-сайта [39].

В заключение этого раздела отметим, что рибосомы *T. thermophilus* в кристаллическом состоянии могут быть получены в виде комплекса, содержащего тРНК одновременно во всех трех классических сайтах. Однако в ряде случаев [PDB id: 5J4C, 5J4B, 5J8B, 4WPO, 4V51, 5VP2, 4V5C, 4V5D, 4V8N, 4WT8] оно достигается за счет контакта Е-тРНК с мРНК, мало напоминающим «правильные» кодон-антикодоновые взаимодействия.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ  
РАБОТЫ ДЕКОДИРУЮЩЕГО ЦЕНТРА РИБОСОМЫ

Отбор тРНК, антикодон которой соответствует кодону в мРНК, проходит в две основные стадии. Сначала aa-тРНК в составе тройного комплекса (с EF-Tu и ГТФ) занимает свое место на рибосоме, т.е. связывается с гибридным А/Т-сайтом. Первые две пары кодон-антикодонного комплекса стабилизируются взаимодействием с нуклеотидными остатками A1492 и A1493 спирали h44 16S рРНК и водородной связью с остатком G530 спирали h18. Образование «правильного» кодон-антикодонного комплекса служит сигналом конформационной перестройки большой области малой субъединицы рибосомы, что, в свою очередь, стимулирует ГТФазную активность EF-Tu, гидролиз ГТФ до ГДФ и ослабление связей тройного комплекса с рибосомой. На втором этапе происходит т.н. аккомодация aa-тРНК, в ходе которой в случае образования «правильного» кодон-антикодонного комплекса aa-тРНК покидает EF-Tu, ее ССА-конец занимает А-сайтовый участок в ПТЦ. При этом aa-тРНК остается связанной с мРНК. Если же при декодировании произошла ошибка, aa-тРНК покидает рибосому.

Неудивительно, что на этой важнейшей стадии трансляции генетической информации, сопровождающейся разного рода конформационными перестройками рибосомы и ее лигандов, аллостерические эффекты проявляются достаточно отчетливо и отличаются разнообразием.

Декодирующий центр малой субъединицы рибосомы, где происходит распознавание и дискриминация кодон-антикодонных комплексов, находится на расстоянии около 80 Å от ГТФазного центра EF-Tu. Участники передачи сигнала об образовании «правильного» кодон-антикодонного комплекса в этот центр хорошо известны: во-первых, это молекула тРНК. Рамакришнан и сотр. показали, что после связывания тройного комплекса с рибосомой, т.е. в гибридном А/Т-состоянии третичная структура тРНК существенно отличается от таковой в свободном комплексе [40]. Соответственно, мутации в молекуле тРНК, которые изменяют макромолекулярную структуру тРНК в А/Т-состоянии, причем достаточно удаленные от декодирующего центра, аллостерически влияют на точность декодирования [41]. Наиболее известная и хорошо изученная мутация здесь – т.н. «супрессор Хирша», мутация G24A в D-петле тРНК<sup>Trp</sup>, которая распознает стоп-кодон UGA как триптофановый [42].

Во-вторых, это достаточно крупный РНК-белковый домен 30S субъединицы (иногда называемый «плечом» этой субъединицы), на

поверхности которого собственно и происходит процесс декодирования. При образовании «правильного» кодон-антикодонного комплекса «плечо» малой субъединицы принимает более компактную форму (переходит из «отрытого» в «закрытое» состояние), что и служит «спусковым крючком» для передачи аллостерического сигнала об этом событии в ГТФазный центр EF-Tu. При этом устанавливается контакт одного из сегментов 16S рРНК этого домена с EF-Tu [43]. События, которые следуют за этим, еще не изучены на уровне отдельных нуклеотидных и аминокислотных остатков, однако, хорошо известно, что важную роль в конформационных превращениях «плеча» 30S субъединицы играют контактирующие друг с другом белки uS4 и uS5. В течение многих лет Далберг, Грегори и О'Коннор изучали влияние мутаций в этих белках на ход процесса декодирования и эффективность действия антибиотиков, ингибирующих этот процесс [44–46]. Они установили, в частности, что нарушение контакта между uS4 и uS5 путем делеции определенных остатков белка uS5 приводит к нарушению точности декодирования мРНК и изменению чувствительности к антибиотикам белка uS12, важного участника регуляции этого процесса. Эти эффекты передавались аллостерически, поскольку тандем uS4–uS5 ни с белком uS12, ни с декодирующим центром прямо не взаимодействуют.

Следует отметить, что отслеживание ГТФазной активности EF-Tu оказалось очень удобным приемом для поиска источников аллостерических сигналов в рибосоме. Так, мутации в компонентах межсубъединичного «моста» B8 (от англ. bridge), состоящего из спиралей h8 и h14 16S рРНК, с одной стороны, и белков uL14 и uL19 большой субъединицы рибосомы, с другой, негативно влияют на ГТФазную активность EF-Tu [47–48]. При этом расстояние от мутированных остатков до ГТФазного центра составляло несколько десятков ангстрем.

На точность декодирования могут влиять не только мутации в РНК и белках малой субъединицы, но и в молекулах РНК большой субъединицы, как в молекуле 5S рРНК [49], так и 23S рРНК, например, в ее спиральных H92 или H89, достаточно удаленных от декодирующего центра [50].

### III. АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНОГО ЦЕНТРА РИБОСОМЫ

Пептилтрансферазный центр рибосомы, катализирующий реакцию транспептидации, построен преимущественно из нуклеотидных остатков рРНК ее большой субъединицы. Поэтому рибосомы относят к классу рибозимов. Эти нуклеотидные остатки, как и в любом другом ферменте, обеспечивают оптимальное относительное расположение субстратов реакции, а именно субстратов реакции транспептидации – аминокислоты, связанной с А-тРНК (А-субстрат), и карбонильной группы С-концевого аминокислотного остатка синтезируемого пептида (Р-субстрат), связанного с тРНК, находящейся в Р-сайте рибосомы. Поскольку Р-субстрат, подвергающийся нуклеофильной атаке свободной  $\text{NH}_2$ -группой А-субстрата, уже заранее активирован на предыдущих этапах трансляции, основной вклад в каталитическую функцию ПТЦ вносит энтропийный фактор.

В ПТЦ рибосомы принято выделять, по крайней мере, два слоя формирующих его нуклеотидных остатков: нуклеотиды, которые непосредственно взаимодействуют с А- и Р-субстратами (первый слой; у рибосом *E. coli* это остатки А2451, U2585 и А2602), и те, которые взаимодействуют с нуклеотидами первого слоя (второй, более обширный слой; у рибосом *E. coli* это остатки А2447, С2063, G2061, А2450, С2452, U2506; сюда же следует отнести нуклеотидные остатки G2553, G2251 и G2252, с которыми образуют комплементарные пары ССА-концы тРНК в А- и Р-сайтах, соответственно, обеспечивая их оптимальную конформацию в активном центре) [51–53]. Ясно, что взаимодействия нуклеотидных остатков первого и второго слоя под определение аллостерических никак не попадают. Однако, уже на расстоянии 10–20 Å от нуклеотидов первого слоя были идентифицированы нуклеотидные и аминокислотные остатки рРНК и белков большой субъединицы, мутации которых влияют на активность как ПТЦ, так и ингибиторов реакции транспептидации (см., например, [54]). Описание детального механизма передачи аллостерических сигналов в этих случаях представляется вполне реальной задачей, однако, насколько нам известно, оно до сих пор не сделано.

Достоверно установлено, что активность ПТЦ регулируется аллостерическими сигналами, которые он получает из примыкающей к нему области рибосомного туннеля (РТ). Этот важный функциональный элемент рибосомы служит для транспорта синтезируемых в ПТЦ полипептидных цепей на поверхность большой субъединицы рибосомы, где осуществляются первые этапы процессинга белков. Кроме того, в РТ расположены сайты связывания многих ингибиторов син-

теза белка, в том числе, ряда антибиотиков, применяемых в клинике и ветеринарии. В достаточно редких, но очень важных случаях растущий пептид, взаимодействуя с элементами стенок РТ (сам по себе или в присутствии антибиотика) полностью ингибирует ПТЦ и тем самым останавливает синтез белка на рибосоме. Это явление рассмотрено в ряде обзорных работ [55–58]. Здесь же необходимо отметить, что Манькиным и сотр. с помощью направленного мутагенеза были идентифицированы нуклеотидные остатки 23S рРНК, которые, будучи расположенными на стенках РТ, участвуют в передаче сигнала об остановке синтеза полипептида в ПТЦ. Ими оказались нуклеотиды A2058, A2503, A2062, U1782 и U2609 [59]. Нуклеотидный остаток A2058 расположен на расстоянии примерно 20 Å от нуклеотидов первого слоя ПТЦ. Он, в частности, участвует в формировании сайта связывания с РТ антибиотика эритромицина. Связываясь с этим сайтом эритромицин направляет в ПТЦ аллостерический сигнал об изменении положения остатка U2585 относительно других остатков первого и второго слоев этого центра [60]. Остановка синтеза белка в этом случае вполне объяснима, поскольку ранее было показано, что нарушение нативной конформации первого слоя ПТЦ (в том числе U2585) неизбежно ведет к его инактивации [61].

Недавно Макаров и др. с помощью молекулярно-динамического моделирования фрагмента рибосомы, содержащего весь ПТЦ и полностью РТ, выявили для некоторых состояний рибосомы возможность скоординированной передачи аллостерического сигнала через образование сплошных стэкинг-взаимодействий у следующей последовательности оснований: A2058 – A2059 – m2A2503 – G2061 – A2062 – C2063 – U2585. Для полного формирования такого каскада основание A2058 должно было отделиться от стопки оснований спирали H73, с которой было связано стэкинг-взаимодействием с основанием A2057 [62]. В конце каскада нуклеотидный остаток A2062 занимает необычное положение между G2061 и C2063, а остаток U2585 из первого слоя ПТЦ, о котором речь шла выше, находится в стэкинге с C2063.

Остается вопрос, может ли ПТЦ обмениваться аллостерическими сигналами с другими функциональными центрами рибосомы. Здесь, как и во многих других случаях, полезная информация была получена сочетанием метода направленного мутагенеза компонентов рибосомы с анализом изменения доступности нуклеотидных остатков рРНК к различным химическим агентам (т.н. «химического пробинга»), вызываемых данной мутацией. Так, мутация в соседней с ПТЦ частью спирали H89 UU2492-3C, речь о которой уже шла выше, влияет на

его функциональную активность и, как это можно было ожидать, вызывает конформационную перестройку ансамбля нуклеотидных остатков, его формирующих. Однако, нарушение геометрии спирали H89 одновременно заметно сказывается на доступности к модифицирующим агентам оснований в т.н. сарцин-рициновой петле 23S рРНК (SRL), или H95 в области связывания элонгационных факторов, сильно удаленной от ПТЦ [26].

Другой пример можно найти в работе Динмана и сотр., которые систематически изучают аллостерические явления в рибосомах дрожжей также с помощью мутагенеза и «химического пробинга». Они исследовали последствия мутаций в структурном элементе рибосомы, который соединяет малую и большую субъединицу в 80S рибосоме, и носит название «мост В1b/c». В его организации принимает участие, в частности, белок eL11 центрального протуберанца 60S субъединицы рибосомы. Он находится достаточно далеко от ПТЦ. Тем не менее, мутации в eL11 затрагивают ПТЦ и целую цепочку спиралей 25S рРНК, по которой, как полагают авторы, и передается аллостерический сигнал [63].

Также пептидилтрансферазная реакция чувствительна к нарушению структуры рибосомы: так, например, отсутствие 5S рРНК, соединяющей домены II и V 23S рРНК, критически нарушает ее протекание, но эффект от изъятия этой рРНК может быть частично компенсирован антибиотиком, соединяющем домены [64].

#### **IV. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ ПРОЦЕСС ТРАНСЛОКАЦИИ**

Деацилированная в результате реакции транспептидации тРНК поэтапно перемещается из Р-сайта в Е-сайт, а пептидил-тРНК – соответственно, из А-сайта в Р-сайт через ряд промежуточных конформационных изменений как в самих тРНК, так и в рибосоме [65]. Этот процесс носит название транслокации.

##### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТУБЕРАНЦА L1 С тРНК**

В процессе транслокации крупные элементы рибосомы согласованно смещаются друг относительно друга. Так, при переходе тРНК в гибридное Р/Е состояние L1 протуберанец 50S субъединицы (назван так по белку uL1, который входит в его состав) изгибается вовнутрь к поверхности раздела субъединиц, смещаясь на ~20 Å. Это состояние называют «закрытой» конформацией протуберанца L1 в отличие от «открытой», когда тРНК в ПТЦ находятся в канонических

А/А- и Р/Р-состояниях. Соответственно, равновесие между этими состояниями обозначается как предтранслокационное. Основное событие этого этапа трансляции – поворот малой субъединицы на  $\sim 8$  Å против часовой стрелки относительно большой и связанное с ним латеральное смещение «головы» малой субъединицы на  $\sim 20$  Å относительно ее «тела». В этом же направлении перемещается на один кодон мРНК [66]. Согласованность движения протуберанца L1 и тРНК была экспериментально установлена методом smFRET для ряда основных этапов транслокации: перехода тРНК из канонического Р/Р- в гибридное Р/Е-состояние [67], связывания протуберанцем тРНК [68], а также поворота субъединиц друг относительно друга [69, 70]. Таким образом, можно выделить два глобальных состояния, 1 и 2 (GS1 и GS2), между которыми осциллирует рибосома. В первом молекулы тРНК находятся в канонических А/А- и Р/Р-сайтах, протуберанец L1 – в «открытой» конформации, а субъединицы не смещены друг относительно друга. Второе глобальное состояние – это следующий этап транслокации, а именно, смещение ССА-концов тРНК на одну позицию по направлению к выходу тРНК из рибосомы, формирование гибридных состояний, описанный выше поворот протуберанца L1 в закрытое положение, что необходимо для удержания тРНК в Р/Е-состоянии, переход самой рибосомы в разомкнутое (unlocked) состояние, сопровождаемый «размыканием» ряда межсубъединичных «мостов» [71], без чего невозможен поворот субъединиц друг относительно друга (состояние GS2 изображено на рис. 4).

Эффективность процесса транслокации критическим образом зависит от присутствия в транслирующей рибосоме элонгационного фактора G (EF-G) в комплексе с ГТФ (см. рис. 1). Он связывается с ГТФазным центром большой субъединицы. И здесь мы встречаемся с рекордным по длине расстоянием, на которое могут передаваться аллостерические сигналы. Было установлено, что бактериальный фактор EF-G регулирует конформационное состояние протуберанца L1, который удален от него на расстояние более чем 170 Å: даже при отсутствии ацилированной тРНК в А- (или А/Р-) сайте образование комплекса EF-G с рибосомой смещает равновесие между открытым и закрытым состояниями протуберанца L1 в сторону последнего [72]. Механизм этой аллостерической связи еще только предстоит установить.

Помимо EF-G, влиять на претранслокационное равновесие рибосомы могут и антибиотики аминогликозиды. Эти соединения связываются в окрестностях декодирующего центра и А-сайта малой субъединицы рибосомы. Известно, что помимо нарушения работы





Рис. 4. Рибосома в претранслокационном состоянии. тРНК находятся в гибридных сайтах (слева направо): А/Р, Р/Е. Показано расстояние в ангстремах от Е-сайта большой субъединицы до ГТФазного центра EF-G. Стиль изображения элементов комплекса – такой же, как на рис. 3. Источник структуры – PDB id: 4V7D.

собственно декодирующего центра, они ингибируют процесс транслокации [73, 74]. Тем же методом FRET, который позволяет зафиксировать межсубъединичное вращение, было показано, что аминокликозид канамицин замораживает рибосому в закрытом состоянии, а виомицин – в открытом. Антибиотик неомицин, связывающийся со спиралью H69, расположенной на некотором удалении от декодирующего центра и формирующей важный межсубъединичный мост B2, при низких концентрациях также фиксировал закрытую конформацию рибосомы [75].

Известны и другие примеры того, как положение протуберанца L1 относительно поверхности субъединиц может быть аллостерически изменено за счет нарушения межсубъединичных контактов. Так, мутации, нарушающие контакт между белками uS13 и uL5, из которых сформирован один из «мостов» рибосомы, и тем самым провоцирующие вращательное смещение малой субъединицы, одновременно стабилизируют «закрытое» положение протуберанца L1. Важно, что эту связь можно наблюдать и в вакантных рибосомах в отсутствие тРНК. И вновь аллостерическую связь между протуберанцем L1 и декодирующим центром рибосомы помогли установить антибиотики. Так, аминогликозид виомицин, связывающийся в районе этого центра, аллостерически стабилизирует одновременно «закрытое» состояние L1-протуберанца и вращательное смещение рибосомных субъединиц друг относительно друга, как в функционирующей, так и в вакантной рибосоме [76].

Помимо динамического равновесия в так называемом претранслокационном состоянии (PRE), рибосома способна спонтанно флуктуировать и в конечное состояние транслокации – посттранслокационное, в литературе обозначаемое как POST, где тРНК окончательно занимают канонические P/P- и E/E- сайты, а субъединицы рибосомы возвращаются в несмещенное положение. В отсутствие EF-G скорость этого перехода недостаточна, чтобы обеспечить нормальное функционирование рибосомы: состояние PRE более энергетически выгодно, нежели POST (при удалении из системы EF-G рибосома спонтанно возвращается в PRE). Ряд аминогликозидов влияют и на это равновесие: так, неомицин увеличивает скорость перехода из PRE в POST в 3, а стрептомицин – в 14 раз, в то время, как тетрациклин снижает ее вчетверо [77]. Связывающийся в ПТЦ спарсомицин также сильно смещает это равновесие в сторону POST, приводя к спонтанной бесфакторной транслокации. [78] Точно так же спонтанную транслокацию вызывает ряд антибиотиков, имеющих сродство к А-сайту большой субъединицы [79].

Как и перемещение между глобальными состояниями претранслокационного комплекса, переход в посттранслокационное состояние, очевидно, затрагивает основные активные центры рибосомы: ПТЦ, декодирующий центр, А-сайт большой субъединицы.

ВЗАИМОСВЯЗЬ EF-G  
И ПРЕТРАНСЛОКАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ РИБОСОМЫ

Как оказалось, выбор претранслокационного состояния рибосомы влияет и на каталитическую активность EF-G: пока рибосома не займет GS2 состояние с гибридным положением тРНК, скорость гидролиза ГТФ, необходимого для высвобождения EF-G из рибосомы, будет чрезвычайно низкой. Еще раньше было известно, что связывание фактора G с вакантной рибосомой слабо катализирует гидролиз ГТФ: для его стимулирования необходима деацилированная тРНК в Р-сайте, способная перемещать свой ССА-конец в Е-сайт [80], хотя фактор способен связаться с рибосомой, находящейся в любом из претранслокационных состояний, и запустить транслокацию из любого из них [81]. Мутация нуклеотидного остатка C2394G, в результате которой происходит замена основания, расположенного напротив 3'-концевого остатка A76 тРНК, когда он находится в Е-сайте, снижает сродство деацилированной тРНК к этому сайту. В результате этой мутации сродство тРНК к Е-сайту рибосомы критически снижается не только при спонтанном связывании тРНК<sup>fMet</sup> в присутствии мРНК и fMetPhe-тРНК<sup>Phe</sup> в Р-сайте: она ингибирует и посттранслокационное удержание деацилированной тРНК в Е-сайте, и образование гибридного Р/Е-состояния претранслокационного комплекса. Рибосомы с такой мутацией, где формирование GS2 затруднено, существенно хуже катализируют гидролиз ГТФ EF-G и, кроме того, в них снижено сродство фактора к рибосоме [82]. Помимо стабилизации GS2-состояния рибосомы за счет каталитической функции элонгационного фактора, он управляет согласованностью транслокации: ГТФазный центр EF-G чувствителен к состоянию рибосомы перед транслокацией, являясь аллостерическим сенсором. Какой из его сайтов связывания с рибосомой отвечает за улавливание аллостерического сигнала, или же эту роль выполняет их совокупность, координированно активируя гидролиз ГТФ, – из экспериментальных данных понять сложно, поскольку, как было изложено выше, претранслокационные перегруппировки в самой рибосоме тоже происходят согласованно.

В другой работе этой научной группы было показано, что удаление части спирали H38 23S рРНК, формирующей межсубъединичный мост V1a путем взаимодействия с белком S13 малой субъединицы, лишь частично снижает эффективность активации гидролиза ГТФ деацилированной тРНК, находящейся в Р/Е-сайте. Можно ожидать поэтому, что передача сигнала здесь происходит по нескольким путям, дублирующим и дополняющим друг друга [83].

В формировании правильного состояния рибосомы, активирующего гидролиз ГТФ ГТФазой EF-G вне всякого сомнения участвует протуберанец L7/L12, состоящий из трех спиралей 23S рРНК – H42–44 и белков uL10 и uL11. Его удлинение только на одну пару в самом основании спирали H42 путем вставки дополнительной уотсон-криковской пары C1030/G1124 снижает ГТФазную активность EF-G. Следует заметить, что при этой мутации происходит изменение доступности к модифицирующим агентам большого числа оснований в рРНК, значительно удаленных от L7/L12, что является следствием существенных перестроек в структуре рибосомы [84]

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА СУЩЕСТВОВАНИЯ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ В РИБОСОМЕ

Нужно заметить, что к настоящему времени накоплено немало примеров распространения последствий мутаций в рРНК на большие расстояния по рибосоме, обнаруживаемых с помощью «химического пробинга».

Мутация A960C затрагивает ряд оснований ПТЦ, делая более доступными для химической модификации связывающие Р-тРНК основания Gm2251 и G2252, и в то же время экранируя нуклеотидные остатки A2518 и U2249 [85].

Мутации A2531U и A2531C, нарушающие третичное взаимодействие вершин спиралей H95 и H91, изменяют профиль модифицируемости ряда оснований GAC (GTPase-associated center, спирали H42–44, формирующие протуберанец, необходимый для ГТФ-зависимой работы факторов трансляции), в том числе образующего третичный контакт со спиралью H97 остатка U1033, а также двух оснований ПТЦ – U2585 и A2572 [25].

Нуклеотидный остаток A2518 также становится доступнее для модификации диметилсульфатом в рибосоме при нарушении целостности SRL (спираль H95) вместе с рядом нуклеотидов спиралей H89, H90–92, H39 (в которые входит и A960), H80, H72, некоторыми остатками ПТЦ и «стебля» спирали H42, участвующей в организации GAC [86].

В целом, представленные здесь данные по изменению степени модификации оснований *E. coli* позволяют связать воедино SRL, трехсоставную вилку из спиралей H90–92, нуклеотидный остаток A2518, находящийся в составе стопки из четырех нуклеотидных остатков вместе с A1127–A1129, которая скрепляет спирали H90 и H89, GAC, а также ПТЦ и H39 со стороны ПТЦ, ведущей по направлению к E-сайту.

В дрожжевой рибосоме мутации белка eL3, повышающие прочность связывания А- и Р-тРНК с рибосомой, вызывают изменения в разнесенных более чем на 100 Å спиральных: они повышают доступность значительной части остатков Н85 и вызывают экранирование ряда оснований спиралей Н89 (А2901, А2920), Н91–92 (А2948, А2958, А2966, G2978 (G2554 в нумерации, принятой для рибосом *E. coli*), Н93 (А3015) и U3009 (U2584 по нумерации для рибосом *E. coli*), т.е. расположенных недалеко от ПТЦ [87].

Глубокая динамическая связность остатков рибосомы позволяет природе создавать устойчивые к антибиотикам штаммы бактерий с помощью мутаций, удаленных от сайтов их связывания с рибосомой. В тех случаях, когда речь идет о небольших расстояниях (см., например [54]), удается проследить последовательность разрушения старых связей и образования новых в последовательности остатков рРНК или белка от точки мутации до области, аффинной к антибиотику. Выявленные таким образом последовательные изменения могли бы служить моделью для понимания аллостерии и на более масштабных расстояниях.

Единичная делеция ΔSer145 в белке uL3 *Staphylococcus aureus* обеспечивает резистентность к линезолиду, чей сайт связывания находится в более чем 20 Å от точки мутации. Сокращение одной из петель белка привело к смещению спирали Н90 23S рРНК от ПТЦ примерно на 2 Å, что и вызвало перестройки в линезолид-связывающем сайте. Наибольшие конформационные изменения при сравнении структур, полученных методом криоэлектронной микроскопии, были обнаружены у остатков 2504–2506, G2576, G2581, U2584 23S рРНК, причем мутации по этим нуклеотидам также могут обеспечивать резистентность к данному антибиотику [88].

Другой антибиотик, анизомицин, обычно в норме связываясь своей ароматической частью в А-щели между А2451 и С2452 по нумерации *E. coli*, теряет свое сродство к рибосомам *Haloarcula marismortui* в результате мутаций G2581А и G2576U, находящихся на расстоянии от сайта связывания не менее 12 и 7 Å, соответственно. Первая мутация приводит к образованию новой водородной связи А2581 с G2576 (сайтом второй мутации) при разрушении связи с U2506, что приводит к изгибу целого блока оснований 2504–2507; U2504 уже связан с А2453, и это смещение в конечном итоге сужает т.н. А-щель. Вторая из упомянутых мутаций, G2576U, также разрушает одну из связей 2504–2507 (а именно G2576 с G2505), вызывая еще больший изгиб этого блока, аналогичный таковому в предыдущем случае [89].

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обсуждаемые в этой обзорной статье сведения достаточно ясно показывают, что рибосома – это гибкая и адаптивная молекулярная машина. В основе ее работы лежат хорошо скоординированные механизмы, детали которых еще предстоит расшифровать.

Современные экспериментальные структурные методы пока не позволяют зафиксировать микродвижения на разных этапах работы такого сложного макромолекулярного комплекса как рибосома, хотя определенный прогресс здесь для более простых биологических структур сейчас наблюдается [90].

В целом, приведенные эмпирические данные свидетельствуют о двух особенностях рибосомы как аллостерической системы:

1. Обмен аллостерическими сигналами наблюдается на разных этапах элонгации в разных точках макромолекулярного комплекса; для осуществления целого набора аллостерических передач рибосома должна быть либо разделена на несколько аллостерических «модулей», либо иметь множество околоравновесных конформаций и в процессе элонгации переключаться в рамках этого набора. Также возможна комбинация этих вариантов, когда некоторые из условных «модулей» взаимозависимы и образуют свой дискретный набор околоравновесных состояний, где разрешены только определенные комбинации состояний отдельных «модулей».

2. Аллостерическая информация распространяется по рибосоме на большие по молекулярным меркам расстояния. Так, E-сайт большой субъединицы рибосомы и сайты связывания фактора EF-G, ГТФазная активность которого требует определенного претранслокационного состояния, разнесены на более чем 100 Å, что сопоставимо с линейными размерами большой субъединицы рибосомы. Согласованным механизмом транслокации можно управлять малыми эффекторами – антибиотиками – как из декодирующего, так и из пептидилтрансферазного центра, что само по себе говорит о высокой связности транслокационного процесса. Высокая связность транслокации также подтверждена многочисленными экспериментами smFRET, фиксирующими крупномасштабные смещения макроэлементов или больших лигандов (тРНК) рибосомы. Управление ГТФазной активностью другого элонгационного фактора – EF-Tu – также затрагивает как минимум значительную, простирающуюся на 70–80 Å, область малой субъединицы рибосомы и выходит в район межсубъединичного моста, а также подвержена влиянию мутаций рНК большой субъединицы рибосомы. Отрицательная аллостерическая связь между A- и E-сайтами, если и существует, то

одной большой субъединицы для ее осуществления недостаточно; следовательно, требуется согласованная работа всего трансляционного механизма. Изменения модифицируемости нуклеотидов могут также происходить на расстоянии десятков ангстрем от точечной мутации. Так что, если независимые аллостерические модули и существуют в рибосоме, их размеры сопоставимы с размерами самого комплекса. Кроме того, стабильное распространение сигналов на такие расстояния требует протяженных жестких элементов РНК.

Основные сенсоры аллостерических переключений, которые можно идентифицировать, исходя из всей совокупности экспериментальных данных, это:

- А-сайт: его способность связать третичный комплекс или свободную aa-тРНК предположительно зависит от ряда факторов;

- ПТЦ: в его неактивном состоянии не происходит перенос пептидной цепи на aa-тРНК в А-сайте либо гидролиз сложного эфира, связывающего пептидную цепь и Р-тРНК;

- гипотетический переключатель в РТ, способный остановить работу ПТЦ (а, возможно, и вызвать диссоциацию А-тРНК) путем формирования сигнала растущим пептидом во взаимодействии с антибиотиком, связывающимся в РТ, и/или стенками РТ;

- ГТФазная активность EF-Tu: структура ГТФазного центра «чувствует» состояние рибосомы, по меньшей мере, малой субъединицы;

- ГТФазная активность EF-G: она чувствительна к типу претранслокационного состояния рибосомы.

Что касается механизма распространения аллостерических сигналов, то наиболее очевидным кандидатом на передачу сигнала на большие расстояния являются стэкинг-взаимодействия между гетероциклическими основаниями рРНК. Они, с одной стороны, стабилизируют длинные и прочные спирали как жесткие элементы, потенциальные проводники сигнала; с другой стороны, методом молекулярной динамики были обнаружены нуклеотидные основания, способные входить и выходить из стэкинг-взаимодействия с протяженными элементами рРНК, например, A2602 и U2585 в ПТЦ, и не удивительно, что мутации именно по этим основаниям критично отражаются на способности ПТЦ к освобождению пептида от тРНК из Р-сайта [51]. Впрочем, гипотетические «переключатели» могут опираться и на другие взаимодействия – водородные связи, солевые мосты и др.

Насколько далеко могут простираться аллостерические пути и насколько они разветвлены и взаимосвязаны? Если говорить о взаимосвязи названных выше аллостерических центров, то, например, можно вспомнить, что антагонизм А- и Е- сайтов усиливается при удлинении пептидной цепи более чем на 3 аминокислотных остатка, что говорит об аллостерической связи между А-сайтом и верхней частью РТ [37], в котором, в свою очередь, есть потенциальный «переключатель», регулирующий активацию ПТЦ.

Очевидно большие размеры минимального аллостерического механизма не позволяют в ближайшем будущем исследовать детали переключения между состояниями экспериментально, например, с помощью ЯМР или других спектральных методов. Однако, мощности современных суперкомпьютеров уже позволяют просчитывать полно-атомные модели рибосомы методом молекулярной динамики в нано- и даже микросекундных временных диапазонах (лишь единственный рекордный расчет составил 1,2 мс). Конечно, такие времена не могут охватить целиком ни одну из стадий элонгационного цикла; для воспроизведения работы рибосомы часто пользуются разными приемами неравновесной динамики, такими, как, например, приведение координат выбранной системы в соответствие электронной плотности низкого разрешения рибосомы, находящейся в интересующем функциональном состоянии. Необходимая для этой операции электронная плотность получается посредством крио-электронной микроскопии рибосом с анализом отдельных изображений (для обзора см. [91]). Кроме того, даже равновесная молекулярная динамика позволила бы проводить сравнительный анализ состояний комплексов рибосомы с лигандами (антибиотиками, тРНК, элонгационными факторами) и свободных рибосом, рибосом дикого типа и несущих мутации. Вполне вероятно, она позволит уловить разницу в конформациях и степени подвижности отдельных атомов и остатков и хотя бы частично ответить на поставленные выше вопросы. Несмотря на все трудности, решение таких задач крайне целесообразно, поскольку оно позволит не только глубже понять то, как работает рибосома, но и разработать принципиально новые подходы к рациональному дизайну новых аллостерических рибосомных антибиотиков.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Steitz, T.M. (2008) A structural understanding of the dynamic ribosome machine, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 242–253.
2. Voorhees, R.M., Ramakrishnan, V. (2013) Structural basis of the translational elongation cycle, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 203–236.
3. Changeux, J.P. (2013) 50 years of allosteric interactions: the twists and turns of the models, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**(12), 819–829.
4. Cornish-Bowden, A. (2014) Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes, *FEBS Journal*, **281**, 621–632.
5. Kleckner, I.R., Gollnick, P., Foster, M.P. (2012) Mechanisms of Allosteric Gene Regulation by NMR Quantification of  $\mu$ s-ms Protein Dynamics, *Journal of Molecular Biology*, **415**(2), 372–381.
6. Stower, H. (2013) Gene Regulation: Allosteric effects, *Nat. Rev. Genet.*, **14**, 238.
7. Cecchini, M., Changeux, J.P. (2015) The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions and allosteric modulation, *Neuropharmacology*, **96**(Pt B), 137–149.
8. Kim, S., Broströmer, E., Xing, D., Jin, J., Chong, S., Ge, H., Wang, S. Gu, Ch., Yang, L., Gao, Y.Q., Su, X., Sun, Y., Xie, X.S. (2013) Probing allostery through DNA, *Science* (New York, NY), **339**(6121), 816–819.
9. Chen, I. (2013) Allostery through DNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 410.
10. Soukup, G.A. (2004) Aptamers meet allostery, *Chem. Biol.*, **11**, 1031–1032.
11. Goodey, N.M., and Benkovic, S.J. (2008) Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route, *Nat. Chem Biol.*, **4**(8), 474–482.
12. Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88–118.
13. Koshland, D.E., Némethy, G., Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, *Biochemistry*, **5**, 365–385.
14. Saibil, H.R., Fenton, W.A., Clare, D.K., Horwich, A.L. (2013). Structure and allostery of the chaperonin GroEL, *J. Mol. Biol.*, **425**, 1476–1487.
15. Hilser, V.J., Wrabl, J.O., Motlagh, H.N. (2012) Structural and energetic basis of allostery, *Ann. Rev. Biophys.*, **41**, 585–609.
16. Hol, T.C, Cox, M.B., Bryant, H.U., Draper, M.W. (1997) Selective estrogen receptor modulators and postmenopausal women's health, *J. Womens Health*, **6**, 523–531.
17. Katzenellenbogen, B.S., Montano, M.M., Ekena, K., Herman, M.E., McInerney, E.M. (1997) Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, **44**, 23–38.
18. Gunasekaran, K., Ma, B., Nussinoy, R. (2004) Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins?, *Proteins*, **57**, 433–443.
19. Feher, V.A., Durrant, J., Van Wart, A.T., Amaro, R.E. (2014) Computational approaches to mapping allosteric pathways, *Current opinion in structural biology*, **25**, 98–103.
20. Holliday, M.J., Camilloni, C., Armstrong, G.S., Vendruscolo, M., Eisenmesser, E.Z. (2017) Networks of dynamic allostery regulate enzyme function, *Structure* (London, England, 1993), **25**(2), 276–286.
21. Daily, M.D., Gray, J.J. (2009) Allosteric Allosteric communication

- occurs via networks of tertiary and quaternary motions in proteins, Jacobson MP, ed. *PLoS Computational Biology*, **5**(2), e1000293.
22. Tsai, C.J., del Sol, A., Nussinov, R. (2008) Allosteric: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play, *J. Mol. Biol.*, **378**, 1–11.
  23. Cooper, A., Dryden, D.T.F. (1984) Allostery without conformational change. A plausible model, *Eur. Biophys. J.*, **11**, 103–109.
  24. Panjkovich, A., Daura, X. (2012) Exploiting protein flexibility to predict the location of allosteric sites, *BMC Bioinformatics*, **13**, 273.
  25. Chan, Y.L., Dresios, J., Wool, I.,G. (2006) A pathway for the transmission of allosteric signals in the ribosome through a network of RNA tertiary interactions, *J. Mol. Biol.*, **355**, 1014–1025.
  26. Burakovskiy, D.E., Sergiev, P.V., Steblyanko, M.A., Konevega, A.L., Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A. (2011) The structure of helix 89 of 23S rRNA is important for peptidyl transferase function of Escherichia coli ribosome, *FEBS Lett.*, **585**, 3073–3078.
  27. Rheinberger, H.J., Sternbach, H., Nierhaus, K.H. (1986) Codon-anticodon interaction at the ribosomal E site, *J. Biol. Chem.*, **261**, 9140–9143.
  28. Gnrirke, A., Geigenmuller, U., Rheinberger, H.J., Nierhaus, K.H. (1989) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. Analysis with a heteropolymeric mRNA, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7291–7301.
  29. Nierhaus, K.H. (1990) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future, *Biochemistry*, **29**, 4997–5008.
  30. Marquez, V., Wilson, D.N., Tate, W.P., Triana-Alonso, F., Nierhaus, K.H. (2004) Maintaining the ribosomal reading frame: the influence of the E site during translational regulation of release factor 2, *Cell*, **118**, 45–55.
  31. Geigenmuller, U., Nierhaus, K.H. (1990) Significance of the third tRNA binding site, the E site, on E. coli ribosomes for the accuracy of translation: an occupied E site prevents the binding of non-cognate aminoacyl-tRNA to the A site, *EMBO J.*, **9**(13), 4527–4533.
  32. Di Giacco, V., Márquez, V., Qin, Y., Pech, M., Triana-Alonso, F.J., Wilson, D.N., Nierhaus, K.H. (2008) Shine-Dalgarno interaction prevents incorporation of noncognate amino acids at the codon following the AUG, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10715–10720.
  33. Nierhaus, K.H. (2006) Decoding errors and the involvement of the E-site, *Biochimie*, **88**, 1013–1019.
  34. Leger, M., Dulude, D., Steinberg, S.V., Brakier-Gingras, L. (2007) The three transfer RNAs occupying the A, P, and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift, *Nucl. Acids Res.*, **35**, 5581–5592.
  35. Liao, P.Y., Gupta, P., Petrov, A.N., Dinman, J.D., Lee, K.H. (2008) A new kinetic model reveals the synergistic effect of E-, P- and A-sites on  $\alpha$ 1 ribosomal frameshifting, *Nucl. Acids Res.*, **36**, 2619–2629.
  36. Semenkov, Y.P., Rodnina, M.V., Wintermeyer, W. (1996) The «allosteric three-site model» of elongation cannot be confirmed in a well-defined ribosome system from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12183–12188.
  37. Chen, C., Stevens, B., Kaur, J., Smilansky, Z., Cooperma, B.S., Goldman, Y.E. (2011) Allosteric vs. spontaneous exit-site (E-site) tRNA dissociation early in protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(41), 16980–16985.
  38. Schmeig, T.M., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2003) Structures of deacylated tRNA mimics bound to the E site of the large ribosomal subunit., *RNA*, **9**(11), 1345–1352.

39. Rakauskaitė, R., Dinman, J.D. (2008) rRNA mutants in the yeast peptidyl-transferase center reveal allosteric information networks and mechanisms of drug resistance, *Nucl. Acids Res.*, **36**(5), 1497–1507.
40. Schmeing, T.M., Voorhees, R.M., Kelley, A.C., Yong-Gui, G., Murphy, F.V. 4th, Weir, J.R., Ramakrishnan, V. (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA, *Science*, **326**, 688–694.
41. Schmeing, T.M., Voorhees, R.M., Kelley, A.C., Ramakrishnan, V. (2011). How mutations in tRNA distant from the anticodon affect the fidelity of decoding, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**(4), 432–436.
42. Hirsh, D. (1970) Tryptophan tRNA of *Escherichia coli*, *Nature*, **228**, 57.
43. James, M.O., Frank, V. Murphy, I.V., Michael, J.T., V. Ramakrishnan (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form, *Cell*, **111**, 721–732.
44. Lodmell, J.S., Dahlberg, A.E. (1997). A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA, *Science*, **277**(5330), 1262–1267.
45. Kamath, D., Gregory, S.T., O'Connor, M. (2017) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**(2), e01186–16.
46. Kamath, D., Allgeyer, B.B., Gregory, S.T., Bielski, M.C., Roelofs, D.M., Sabapathypillai, S.L., Vaid, N., O'Connor, M. (2017) The C-terminus of ribosomal protein uS4 contributes to small ribosomal subunit biogenesis and the fidelity of translation, *Biochimie*, **138**, 194–201.
47. McClory, S.P., Leisring, J.M., Qin, D., Fredrick, K. (2010) Missense suppressor mutations in 16S rRNA reveal the importance of helices h8 and h14 in aminoacyl-tRNA selection, *RNA*, **16**(10), 1925–1934.
48. Fagan, C.E., Dunkle, J.A., Maehigashi, T., Dang, M.N., Devaraj, A., Miles, S.J., Daoming, Q., Fredrick, K., Dunham, C. M. (2013). Reorganization of an intersubunit bridge induced by disparate 16S ribosomal ambiguity mutations mimics an EF-Tu-bound state, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **110**(24), 9716–9721.
49. Smith, M.W., Meskauskas, A., Wang, P., Sergiev, P.V., Dinman, J.D. (2011) Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **21**(24), 8264–8275.
50. O'Connor, M., Dahlberg, A.E. (1995) The involvement of two distinct regions of 23 S ribosomal RNA in tRNA selection. *J. Mol. Biol.*, **254**, 838–847.
51. Polacek, N., Gomez, M.J., Ito, K., Xiong, L., Nakamura, Y., Mankin, A. (2003) The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination, *Mol. Cell.*, **11**, 103–112.
52. Youngman, E.M., Brunelle, J.L., Kochaniak, A.B., Green, R. (2004) The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release, *Cell*, **117**, 589–599.
53. Simonovic, M., Steitz, T.A (2008) Cross-crystal averaging reveals that the structure of the peptidyl-transferase center is the same in the 70S ribosome and the 50S subunit, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **105**, 500–505.
54. Long, K.S., Vester, B. (2012) Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 603–612.

55. Tenson, T., Ehrenberg, M. (2002) Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel, *Cell*, **108**, 591–594.
56. Bogdanov, A.A., Sumbatyan, N.V., Shishkina, A.V., Karpenko, V.V., Korshunova, G.A. (2010) Ribosomal tunnel and translation regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1501.
57. Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S. (2014) Triggering peptide-dependent translation arrest by small molecules: ribosome stalling modulated by antibiotics, *Regulatory Nascent Polypeptides*, ed. Ito K (Springer, New York).
58. Ito, K., Chiba, S. (2013) Arrest peptides: Cis-acting modulators of translation, *Annu Rev. Biochem.*, **82**, 171–202.
59. Vázquez-Laslop, N., Ramu H., Mankin A. (2011) Nascent peptide-mediated ribosome stalling promoted by antibiotics, *Ribosomes: Structure, Function, and Dynamics*, Section V, 377–392.
60. Sothilsvam, S., Liu, B., Han, W., Ramu, H., Klepacki, D., Atkinson, G.C., Brauer A., Remm, M., Tenson, T., Schulten, K., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S. (2014). Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111(27)**, 9804–9809.
61. Seidelt, B., Innis, C. A., Wilson, D. N., Gartmann, M., Armache, J.-P., Villa, E., Leonardo G.T., Becker, T., Mielke, T., Schulten, K., Steitz, T.A., Beckmann, R. (2009). Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling, *Science (New York, N.Y.)*, **326(5958)**, 1412–1415.
62. Makarov, G.I., Golovin, A.V., Sumbatyan, N.V., Bogdanov, A.A. (2015) Molecular dynamics investigation of a mechanism of allosteric signal transmission in ribosomes, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1047–1056.
63. Rhodin, M.H.J and Dinman, J.D. (2011) An extensive network of information flow through the B1b/c inter-subunit bridge of the yeast ribosome, *PLoS One*, **6(5)**, e20048.
64. Khaitovich, P and Mankin, A.S. (1999) Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5 S rRNA, *J. Mol. Biol.*, **291**, 1025–1034.
65. Fischer, N., Konevega, A.L., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., Stark, H. (2010) Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy, *Nature*, **466**, 329–333.
66. Frank, J., Agrawal, R.K. (2000) A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation, *Nature*, **406**, 318–322.
67. Blanchard, S.C., Kim, H.D., Gonzalez, R.L., Puglisi, J.D., Chu, S. (2004). tRNA dynamics on the ribosome during translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101(35)**, 12893–12898.
68. Fei, J., Kosuri, P., MacDougall, D.D., Gonzalez, R.L. (2008) Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation, *Mol. Cell*, **30**, 348–359.
69. Cornish, P.V., Ermolenko, D.N., Noller, H.F., Ha, T. (2008) Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes, *Mol. Cell.*, **30**, 578–588.
70. Cornish, P.V., Ermolenko, D.N., Staple, D.W., Hoang, L., Hickerson, R.P., Noller, H.F., Ha, T. (2009). Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106(8)**, 2571–2576.
71. Liu, Q., Fredrick, K. (2013). Contribution of intersubunit bridges to the energy barrier of ribosomal translocation, *Nucleic Acids Research*, **41(1)**, 565–574.
72. Fei, J., Bronson, J.E., Hofman, J.M., Srinivas, R.L., Wiggins, C.H., Gonzalez, R.L. (2009). Allosteric

- collaboration between elongation factor G and the ribosomal L1 stalk directs tRNA movements during translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(37), 15702–15707.
73. Shoji, S., Walker, S.E., Fredrick, K. (2009). Ribosomal translocation: one step closer to the molecular mechanism, *ACS Chemical Biology*, **4**(2), 93–107.
74. Tsai, A., Uemura, S., Johansson, M., Puglisi, E.V., Marshall, R.A., Aitken, C.E., Korlach, J., Ehrenberg, M., Puglisi, J. D. (2013) The impact of aminoglycosides on the dynamics of translation elongation, *Cell Reports*, **3**(2), 497–508.
75. Wang, L., Pulk, A., Wasserman, M.R., Feldman, M.B., Altman, R.B., Cate, J.H.D., Blanchard, S.C. (2012). Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**(9), 957–963.
76. Ning, W., Fei, J., Gonzalez, R.L. (2014). The ribosome uses cooperative conformational changes to maximize and regulate the efficiency of translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**(33), 12073–12078.
77. Shoji, S., Walker, S.E., Fredrick, K. (2006) RReverse translocation of tRNA in the ribosome *Molecular Cell*, **24**(6), 931–942.
78. Fredrick K., Noller H.F. (2003) Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin, *Science*, **300**, 1159–1162.
79. Ermolenko, D.N., Cornish, P.V., Ha, T., Noller, H.F. (2013). Antibiotics that bind to the A site of the large ribosomal subunit can induce mRNA translocation, *RNA*, **19**(2), 158–166.
80. Zavialov, A.V., Ehrenberg, M. (2003) Peptidyl-tRNA regulates the GTPase activity of translation factors, *Cell*, **114**, 113–122.
81. Chen, C., Stevens, B., Kaur, J., Cabral, D., Liu, H.Q., Wang, Y.H., Zhang, H.B., Rosenblum, G., Smilansky, Z., Goldman, Y.E., Cooperman, B.S. (2011) Single molecule fluorescence measurements of ribosomal translocation dynamics, *Mol. Cell*, **42**, 367–377.
82. Sergiev, P.V., Lesnyak, D.V., Kiparisov, S.V., Burakovsky, D.E., Leonov, A.A., Bogdanov, A.A., Brimacombe, R., Dontsova, O.A. (2005). Function of the ribosomal E-site: a mutagenesis study, *Nucleic Acids Research*, **33**(18), 6048–6056.
83. Sergiev, P.V., Kiparisov, S.V., Burakovsky, D.E., Lesnyak, D.V., Leonov, A.A., Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A. (2005) The conserved A-site finger of the 23S rRNA: just one of the intersubunit bridges or a part of the allosteric communication pathway, *J. Mol. Biol.*, **353**, 116–123.
84. Sergiev, P.V., Lesnyak, D.V., Burakovsky, D.E., Kiparisov, S.V., Leonov, A.A., Bogdanov, A.A., Brimacombe, R., Dontsova, O.A. (2005) Alteration in location of a conserved GTPase-associated center of the ribosome induced by mutagenesis influences the structure of peptidyltransferase center and activity of elongation factor G, *J. Biol. Chem.*, **280**, 31882–31889.
85. Sergiev, P.V., Bogdanov, A.A., Dahlberg, A.E., Dontsova, O.A. (2000) Mutations at position A960 of *E. coli* 23S ribosomal RNA influence the structure of 5S ribosomal RNA and the peptidyltransferase region of 23S ribosomal RNA, *J. Mol. Biol.*, **299**, 379–389.
86. Lancaster, L., Lambert, N.J., Maklan, E.J., Horan, L.H., Noller, H.F. (2008). The sarcin-ricin loop of 23S rRNA is essential for assembly of the functional core of the 50S ribosomal subunit, *RNA*, **14**(10), 1999–2012.
87. Petrov, A., Meskauskas, A., Dinman, J.D. (2004) Ribosomal protein L3: influence on ribosome structure and function, *RNA biology*, **1**(1), 59–65.

88. Belousoff, M.J., Eyal, Z., Radjainia, M., Ahmed, T., Bamert, R.S., Matzov, D., Bashan, A., Zimmerman, E., Mishra, S., Cameron, D., Elm-lund, H., Peleg, A.Y., Bhushan, S., Lithgow, T., Yonath, A. (2017). Structural basis for linezolid binding site rearrangement in the *Staphylococcus aureus* ribosome, *mBio*, **8(3)**, e00395–17.
89. Blaha, G., Gurel, G., Schroeder, S.J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2008). Mutations outside the anisomycin binding site can make ribosomes drug-resistant, *Journal of molecular biology*, **379(3)**, 505–519.
90. Stagno, J.R., Liu, Y., Bhandari, Y.R. et al. (2017) Structures of riboswitch RNA reaction states by mix-and-inject XFEL serial crystallography, *Nature*, **541**, 242-246.
91. Makarov, G.I., Makarova, T.M., Sumbatyan, N.V., Bogdanov, A.A. (2016) Investigation of ribosomes using molecular dynamics simulation methods, *Biochemistry (Moscow)*, **81(13)**, 1579–1588.
92. Achenbach, J., Nierhaus, K.H. (2013) Translocation at work, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1019–1022.