

РИБОСОМНЫЙ ТУННЕЛЬ И РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

©2010 г.

А. А. БОГДАНОВ, Н. В. СУМБАТЯН,
А. В. ШИШКИНА, В. В. КАРПЕНКО,
Г. А. КОРШУНОВА

*Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
и Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Строение рибосомного туннеля. III. О конформации растущей полипептидной цепи в рибосомном туннеле. IV. Взаимодействие рибосомного туннеля с антибиотиками. V. Участие рибосомного туннеля в регуляции экспрессии генов. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В ходе трансляции генетической информации полипептидная цепь вновь образуемой молекулы белка остается связанной с рибосомой вплоть до завершения синтеза. При этом, начиная с первых шагов процесса трансляции, определенная часть синтезируемой полипептидной цепи находится в рибосомном туннеле (РТ). Этот важный структурный элемент рибосомы расположен в ее большой субъединице; его начало перекрывается с пептидилтрансферазным центром (ПТЦ) рибосомы, а там, где РТ заканчивается, находятся ассоциированные с рибосомой белки, принимающие участие в котрансляционном сворачивании и модификации белковой молекулы. Таким образом, главная функция РТ состоит в том, чтобы обеспечить беспрепятственный выход вновь синтезированной полипептидной цепи из рибосомы и доставку ее к месту формирования функционально полноценной белковой молекулы.

Принятые сокращения: РТ – рибосомный туннель, ПТЦ – пептидилтрансферазный центр рибосомы, РСА – рентгеноструктурный анализ, КЭМ – криоэлектронная микроскопия, FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии.

Адрес для корреспонденции: bogdanov@belozersky.msu.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (04-04-49480-а, 07-04-00902-а, 10-04-01187-а, 09-04-12064-офи_м), грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-1284.2008.4 и НШ-3314.2010.4.

Основные этапы, главные участники и базовые принципы процесса биосинтеза белка на рибосоме были установлены к началу 1970-х годов в результате бурного прогресса молекулярной биологии в первые 15 лет ее существования. Рибосомный туннель не был здесь исключением. В конце 1960-х – начале 1970-х годов сначала Малкин и Рич [1], а затем Блобель и Сабатини [2] нашли, что С-концевые районы белков длиной в 30–40 аминокислотных остатков, синтезируемых рибосомами ретикулоцитов кролика и печени крысы, соответственно, не расщепляются протеолитическими ферментами. Они пришли к заключению, что в рибосоме существует некий канал или туннель, внутри которого перемещаются вновь синтезированные полипептидные цепи. Однако только 12 лет спустя Лейк и сотр. вернулись к представлению о том, что в рибосоме существует туннель, который служит для транспорта синтезируемого белка [3, 4]. С помощью иммуноэлектронной микроскопии они обнаружили, что уже практически завершенная вновь образованная молекула белка находится на прямо противоположном от места начала ее синтеза участке рибосомы. Через несколько лет Миллигэн и Анвин [5], а затем Йонат и сотр. [6] обнаружили туннель в большой субчастице рибосомы с помощью криоэлектронной микроскопии (КЭМ) и также высказали предположение, что по РТ перемещаются синтезируемые рибосомой полипептидные цепи белков. Интерпретация результатов этих работ встретила вполне обоснованную для того времени критику со стороны других авторов, полагавших, что синтезируемый рибосомой полипептид перемещается по ее поверхности [7, 8]. Более детально расположение и параметры РТ уже значительно позже были описаны Франком и сотр., которые существенно повысили разрешение КЭМ при исследовании рибосом и их функциональных комплексов [9]. Однако окончательно вопрос о РТ как о структурном элементе большой субчастицы рибосомы, выполняющим роль проводника вновь синтезируемых полипептидов, можно было считать решенным только после публикации работы Чоя и Бримакомба в 1998 г. [10]. Эти авторы изучали ковалентное сшивание N-концов синтезируемых рибосомами *E. coli* пептидов различной длины с 23S рРНК. Полученные результаты были проанализированы в рамках модели пространственной структуры 50S субъединицы рибосомы *E. coli*, разработанной Бримакомбом, ван Хиллом и др. на базе данных высокоразрешающей КЭМ и многочисленных результатов химических, биохимических и генетических анализов. Модель с высокой точностью описывала расположение РТ в теле 50S субчастицы [11], и когда были опубликованы атомные модели большой субчастицы

археобактериальной [12, 13] и эубактериальной [14] рибосомы, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА), оказалось, что обнаруженные в опытах по ковалентному сшиванию нуклеотидные остатки 23S рРНК действительно расположены в должном порядке на стенках РТ [15, 16].

Наличие рентгеноструктурных данных достаточно высокого разрешения и построенных на их основе атомных моделей рибосомы, ее субчастиц и целого ряда функциональных комплексов рибосомы с субстратами и белковыми факторами трансляции оказало в последнее десятилетие огромное влияние на развитие исследований в области биосинтеза белка (для обзора см. [18]). Современные представления о строении и функционировании РТ также в значительной мере базируются на этих основополагающих работах либо напрямую, либо косвенно через интерпретацию биохимических и генетических данных в свете существующих атомных структур. Именно они и составляют основу настоящей обзорной статьи. Читатель, которого интересуют результаты работ предыдущего периода, может найти их в прекрасном обзоре Хардести и Крамер [19].

Существует несколько причин, по которым РТ привлекает пристальное внимание исследователей. Во-первых, это сравнительно новый и малоизученный структурный элемент рибосомы. Детально его начали изучать менее десяти лет назад. Во-вторых, РТ принципиально отличается от известных на сегодня каналов в мембранных структурах, по которым перемещаются белки и пептиды. В-третьих, в РТ расположены сайты связывания многих (в т.ч. клинически важных) антибиотиков и, как следствие этого, модификация стенок РТ приводит к устойчивости бактерий (в т.ч. патогенных) к антибактериальным препаратам. И, наконец, стенки РТ участвуют в мониторинге аминокислотной последовательности перемещающегося вдоль них полипептида. В ряде случаев полипептиды вступают в сильные взаимодействия со стенками РТ, что приводит к остановке (аресту) трансляции. Это событие является ключевым моментом процесса регуляции транскрипции-трансляции ряда генов. И хотя детально изученных систем, в которых регуляция экспрессии генетической информации осуществляется с участием РТ, на сегодня описано не так много, уже сейчас ясно, что они сильно различаются по своему функциональному назначению, а сами регуляторные механизмы достаточно разнообразны (см., например, [20]).

II. СТРОЕНИЕ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ

Как уже отмечалось, рибосомный туннель уникален: все известные на сегодня клеточные каналы, туннели и поры (за одним интересным исключением [21, 22]), через которые осуществляется транспорт ионов, молекул воды, низко- и высокомолекулярных органических соединений (включая белки и нуклеиновые кислоты), а также макромолекулярных комплексов, построены из белковых молекул. В то же время стенки РТ и их ближайшее окружение состоят преимущественно из нуклеотидных остатков рРНК большой субъединицы рибосомы и только двух-трех небольших сегментов рибосомных белков (рис. 1). В организации структуры РТ принимают участие нуклеотидные остатки пяти из шести доменов, которые обычно выделяют во вторичной структуре этой рРНК [11]. Уже только одно это обстоятельство говорит о том, что рибосомный туннель формируется за счет сложной системы третичных контактов между удаленными во вторичной структуре районами рРНК. Таким образом, РТ подобен всем остальным функциональным центрам рибосомы, построенным преимущественно (а ПТЦ – целиком) из нуклеотидных остатков рРНК. Нуклеотиды, формирующие РТ, в подавляющем большинстве весьма консервативны [13].

Длина рибосомного туннеля прямо связана с размерами большой субъединицы рибосомы и ее рРНК: у бактериальных рибосом она составляет примерно 90 Å [13, 14], у рибосом эукариот – около 100 Å [23], у митохондриальных рибосом – около 60 Å [24, 25]. В то же время, диаметр РТ у всех рибосом, независимо от источника выделения, одинаков. Он равен примерно 15 Å в верхней (примыкающей к ПТЦ) трети РТ; в средней части туннель сужается и его диаметр уменьшается до 10 Å; далее туннель вновь расширяется, а на его выходе образуется воронкообразная структура, ее максимальный диаметр достигает примерно 25 Å. В суженной центральной части туннеля его стенки образованы в основном аминокислотными остатками вершин β-петель белков большой субъединицы рибосомы L4 и L22 (L17 – у эукариот) [13]. Поблизости от выхода из РТ в организации структуры его стенки принимает участие также β-петля белка L23 (L32a – у архей, Rpl25 – у дрожжей, L39 – у других эукариот) [13, 14]. Сам выход из РТ обрамлен глобулярной частью белка L22 (Rpl17 – у дрожжей), а также белками L24 (Rpl24 – у дрожжей), L29 (Rpl29 – у дрожжей) и L32 [23].

Ансамбль белков, расположенных на выходе из РТ, выполняет чрезвычайно важную функцию: он образует площадку для связывания группы белковых факторов и ферментов, осуществляющих ран-

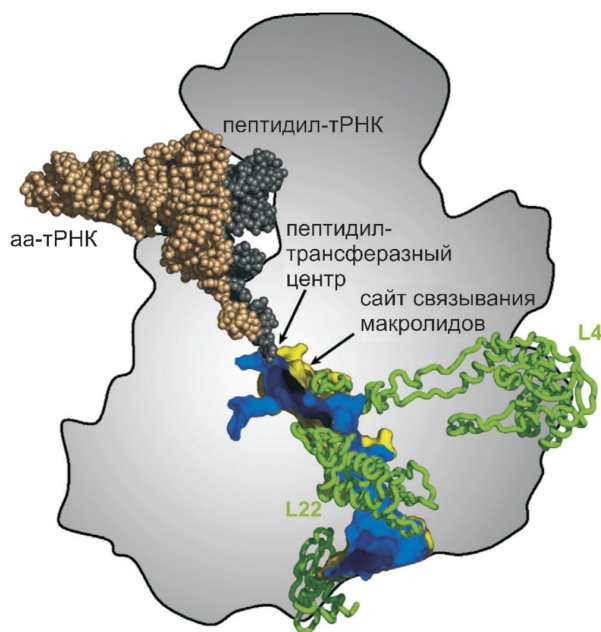


Рис. 1. Схема расположения рибосомного туннеля в 50S субъединице рибосомы (разрез вдоль длинной оси РТ).

Стенки туннеля показаны синим цветом; центр связывания макролидов – желтым цветом; белки, участвующие в формировании стенок РТ, – зеленым цветом. (Более детально верхняя треть РТ представлена на рис. 9).

Адаптировано из [86].

ние стадии котрансляционного процессинга вновь образованных белков, а также транспорт к рецепторам на клеточных мембранах тех из них, которые в своей N-концевой части несут сигнальные последовательности секреции [26]. Среди этих белков в настоящее время точно установлено место связывания с бактериальной рибосомой шаперона TF (т.н. триггер-фактора) и ассоциированной с ним полипептид-деформилазы, которая удаляет формильную группу с N-концевого остатка метионина [27]. В состав этого комплекса входят также метионин-аминопептидазы (МАР), удаляющие N-концевой остаток метионина (как у про-, так и у эукариот), пептидил-пролил-изомеразы и N-ацетилазы [28]. Небольшая часть рибосом здесь же на выходе из РТ связана с SRP (сигнал-узнающими частицами), предназначенными для переноса рибосомы, синтезирующей мембранный или секретируемый белок, на транслокон, расположенный в эндоплазматическом ретикулеуме [26].

Большинство нуклеотидных остатков рРНК, формирующих стенки РТ, обращены в пространство туннеля своими гетероциклическими основаниями [13]. Для находящейся в РТ полипептидной цепи белка это создает возможность образования водородных связей и гидрофобных контактов (подробнее см. раздел V). Сахаро-фосфатный остов рРНК, расположенный вблизи стенок туннеля, создает в РТ отрицательный потенциал, который распределен вдоль РТ неравномерно [29, 30]. Действительно, если в растущую полипептидную цепь генно-инженерным путем ввести короткие блоки из остатков аргинина или лизина, ее движение по туннелю будет затруднено, причем ограничение в продвижении зависит от реального расположения таких блоков в РТ [31]. В то же время, на стенках туннеля нет обширных гидрофобных или гидрофильных областей: их наличие сделало бы туннель непроходимым для многих реально присутствующих в белках аминокислотных последовательностей. РТ сильно гидратирован; более того, он связан с поверхностью большой субъединицы множеством «микроканалов», через которые могут достаточно свободно проходить молекулы воды и гидратированные ионы (но не полипептидные цепи) [32].

Рибосома представляет собой молекулярную машину, для которой характерна ярко выраженная конформационная подвижность [33, 34]. В ходе элонгационного цикла происходит не только движение субъединиц рибосомы друг относительно друга [34], но и скоординированные с образованием каждой новой пептидной связи периодические изменения в структуре субъединиц рибосомы и факторов трансляции [35–37]. Поэтому неудивительно, что в литературе периодически обсуждается вопрос о конформационной подвижности РТ. Крайняя точка зрения была высказана Франком и сотр. [38], которые сравнили параметры туннеля у рибосом *E. coli* дикого типа и у устойчивых к антибиотикам эритромицину мутантов рибосом, содержащих аминокислотные замены в смотрящих во внутрь РТ белках L4 и L22. Интерпретируя результаты, полученные с помощью КЭМ, авторы заключили, что мутации в белках, участвующих в формировании стенок РТ, приводят к почти двукратному увеличению его диаметра. Было высказано предположение, что в той части РТ, где он сильно сужен (т.е. в том районе, который образован белками L4 и L22), туннель проталкивает полипептидную цепь к выходу из РТ, работая как перистальтический насос, т.е. периодически сужаясь и расширяясь [38]. Другая группа авторов также на основании данных КЭМ относительно невысокого разрешения, высказала предположение, что размеры РТ могут увеличиваться настолько, что внутри него растущая полипептидная цепь способна сложиться в «рудиментарные

глобулярные структуры» [39]. Этим предположениям, однако, по-видимому, придется остаться красивыми гипотезами: детальный анализ рентгеноструктурных данных показал, что столь сильное изменение параметров РТ невозможно, поскольку оно требует глобального изменения всей структуры большой субъединицы рибосомы, особенно жесткой в районе РТ [32]. Максимальный диаметр структурного элемента белковой молекулы, который может разместиться в РТ, соответствует α -спирали. Тем не менее, как будет показано ниже, локальные изменения конформации нуклеотидных и аминокислотных остатков, выстилающих стенки РТ, не только возможны, но и реализуются при функционировании рибосомного туннеля. Высказываются предположения, что эти конформационные переходы участвуют в каскадной передаче сигналов вдоль стенок РТ (см., например, [40]), что вполне соответствует современным представлениям о взаимосвязи функциональных центров рибосомы [41, 42].

III. О КОНФОРМАЦИИ РАСТУЩЕЙ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ В РИБОСОМНОМ ТУННЕЛЕ

В литературе описано несколько экспериментальных подходов, позволяющих выделить препарат рибосом вместе с вновь синтезированным полипептидом. В одних случаях они основаны на использовании в бесклеточной системе синтеза белка матрицы, представляющей собой сегмент природной мРНК, не содержащий стоп-кодонов (т.н. «транскрибированной» или укороченной мРНК) [43, 44]. В других случаях конструируют мРНК, в которую включены последовательности, кодирующие тот или иной полипептид, способный останавливать трансляцию (обычно называемый «стоп-пептидом») и, как правило, специальный «якорный» пептид на N-конце цепи для последующей аффинной хроматографии [45]. Полученные этими методами комплексы были недавно исследованы Бэкманом и сотр. с помощью КЭМ с рекордно высоким для этого метода разрешением (5,5–7,0 Å) [46, 47]. При этом следует заметить, что изучить комплекс рибосомы с закрепленным в ней растущим полипептидом методом РСА пока еще никому не удалось, хотя такие попытки систематически делаются.

Итак, растущий полипептид может находиться в рибосомном туннеле либо в форме α -спирали, либо в виде развернутой цепи. Зная длину РТ (90 Å) и расстояние, приходящееся на один аминокислотный остаток в той или иной вторичной структуре полипептида, легко подсчитать, что находящаяся в РТ часть полностью α -спирального полипептида будет состоять из (90:1,5) примерно из 60 аминокислот-

ных остатков; для полностью развернутого полипептида (90:3,5) это значение должно составлять около 25. В то же время, из биохимических данных уже давно известно, что бактериальная рибосома защищает от расщепления протеазами вновь синтезированный полипептид длиной порядка 40 аминокислотных остатков [1, 2]. Отсюда можно предположить, что внутри РТ часть полипептидной цепи находится в развернутой конформации, а часть – принимает форму α -спирали. Все имеющиеся на сегодня структурные данные подтверждают это предположение.

Сначала Джонсоном и сотр. методом FRET было установлено, что трансмембранные сегменты синтезируемых рибосомой мембранных белков, не покидая РТ, принимают компактную, скорее всего, α -спиральную конформацию. По мнению авторов, она образуется в верхней части РТ (т.е. в районе ПТЦ) и сохраняется при перемещении сегмента по туннелю [48]. Последний вывод следовал из данных по химическому сшиванию растущего полипептида со стенками РТ, согласно которым по мере перемещения вниз по туннелю трансмембранный сегмент, сохраняя свою компактность, ковалентно сшивался сначала с белком L4, затем L7 (L22) и, наконец, с белком L39 [48]. Далее, Дойч и сотр. в обширном исследовании, проведенном как на модельной [30], так и на природной системе [49], используя комплекс химических методов, также показали, что сегменты полипептида, находящегося в РТ эукариотической рибосомы, способны образовывать α -спирали. Происходило это только тогда, когда этот тип вторичной структуры был для аминокислотной последовательности данного сегмента предпочтительным. В первом случае в различные положения полипептидной цепи фрагмента одного из доменов белка, образующего калиевый канал, вводили олигоаланиновые блоки длиной 5, 10 и 15 аминокислотных остатков, для которых, как известно, α -спиральная конформация предпочтительна. Используя укороченную мРНК, пептид «замораживали» в РТ. При этом пептид содержал единственный остаток цистеина, который находился на расстоянии в 38 аминокислотных остатков от его С-конца (т.е. от ПТЦ). Если пептид был в развернутой конформации, то остаток цистеина находился вне РТ, и его можно было обнаружить с помощью химической модификации N-полиэтиленгликоль-малеимидом. Реагент имел молекулярную массу 5 кД и во внутрь РТ проникнуть не мог. Если же олигоаланиновые сегменты принимали α -спиральную конформацию, то остаток цистеина находился внутри РТ и химической модификации не подвергался. Авторы нашли, что в определенных зонах РТ растущий пептид способен сворачиваться в

достаточно стабильные α -спирали. Еще более убедительные результаты были недавно получены той же группой исследователей при изучении конформации в РТ сегментов природного белка, содержащих более одного остатка цистеина [49, 50]. Используя проникающие в РТ реагенты, катализирующие образование S–S-связей, авторы оценивали расстояния между остатками цистеина в полипептидной цепи и пришли к выводу, что РТ играет активную роль в формировании α -спиральной конформации вновь синтезируемого белка. При этом наиболее отчетливой способностью модулировать образование спиралей обладает ближайшая к выходу треть РТ, получившая название «альфа-зоны». Именно при перемещении в эту зону происходил переход вторичной структуры полипептида из развернутой в α -спиральную. Поскольку эти спирали сохранялись при транслокации в мембранные структуры, был сделан вывод о важности внутритуннельного сворачивания растущей полипептидной цепи в биогенезе белков.

Здесь необходимо отметить, что еще в середине 1980-х годов Лим и Спирин провели детальный стереохимический анализ пептидилтрансферазной реакции и пришли к выводу, что уже на ранних стадиях синтеза белка его полипептидная цепь сворачивается в регулярную α -спиральную структуру. Они предположили, что образование такой структуры важно для последующего правильного фолдинга макромолекулы вновь синтезированного белка [51].

Недавно Бекман и сотр. идентифицировали α -спиральные сегменты растущей в туннеле рибосомы полипептидной цепи белка прямым методом [52]. Как уже отмечалось, в лаборатории этого исследователя достигнуто столь высокое разрешение при КЭМ-анализе рибосомы, что электронную плотность, соответствующую α -спиралям белка, можно отчетливо наблюдать на фоне других структурных элементов рибосомы. Авторы включили 25-членный полипептид в два различных участка синтезируемого 80S рибосомой проростков пшеницы сегмента дипептидилпептидазы В II типа. Он был закодирован в укороченной мРНК (без стоп-кодона) и имел длину в 90 остатков. Полипептид-вставка представлял собой пятикратный повтор последовательности ЕАААК, который в растворе [53] и в составе одного из антифризовых белков рыб [54] существует в виде классической α -спирали, благодаря присутствию аланиновых блоков и образованию солевых мостиков между остатками глутаминовой кислоты и лизина. Когда после ареста трансляции этот сегмент размещался в последней трети РТ, он принимал α -спиральную конформацию, отчетливо различимую с помощью КЭМ (рис. 2). Если же его

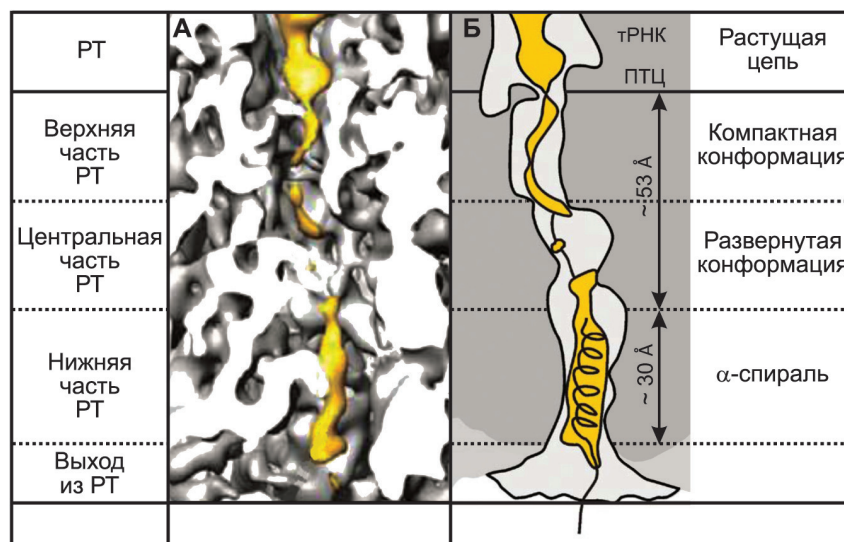


Рис. 2. Растущая полипептидная цепь в РТ эукариотической рибосомы.

А. Распределение электронной плотности полипептида и его окружения в РТ по данным КЭМ. тРНК и полипептид показаны желтым цветом.

Б. Схематическая интерпретация электронно-микроскопического изображения, показанного на рис. 2А.

Адаптировано и модифицировано из [52].

помещали в центральную часть РТ, полипептидная цепь оставалась в развернутом виде (несмотря на то, что, как подчеркивалось выше, благодаря своей аминокислотной последовательности, она предпочитает в растворе находиться в виде α -спирали). Авторы смогли идентифицировать некоторые контакты полипептида со стенками туннеля и пришли к выводу, что белок L39 является важнейшим компонентом «альфа-зоны» РТ рибосомы. Интересно, что в обоих случаях наблюдалось образование некой компактной структуры участков полипептидов (не содержащих встроенные сегменты), расположенных в верхней части РТ рядом с ПТЦ. В каноническую α -спиральную конформацию эти структуры, однако, не вписывались [52].

Таким образом, вся совокупность приведенных здесь данных говорит о том, что, во-первых, участки растущей в РТ полипептидной цепи белка с определенными аминокислотными последовательностями способны принимать α -спиральную (или близкую к ней) конформацию и, во-вторых, переход в эту конформацию (равно, как и закрепление в конформации развернутой цепи) модулируется взаимодействием

полипептида со стенками туннеля в его специфических зонах. Последнее обстоятельство, а именно активная роль РТ в организации и стабилизации вторичной структуры синтезируемой на рибосоме полипептидной цепи белка, особенно важно, поскольку известно, что вторичная структура неупорядоченных участков белковой молекулы флуктуирует с огромной скоростью (на много порядков превышающей скорость синтеза белка) между конформациями, характерными для α -спирали, β -структуры и РРП-спирали [55].

IV. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ С АНТИБИОТИКАМИ

Бактериальная рибосома служит мишенью для примерно половины используемых в клинике антибиотиков [56]. Поэтому одним из основных достижений кристаллографии рибосом следует считать расшифровку атомной структуры их комплексов с антибиотиками различных классов (см. обзоры [57, 58]). Хотя эти исследования в первую очередь важны для создания новых антибактериальных препаратов и выяснения причин устойчивости белкового синтеза к антибиотикам, они принесли также (и продолжают приносить) исключительно важную информацию о потенциальных сайтах взаимодействия растущей в ходе синтеза белка полипептидной цепи со стенками РТ.

Как уже отмечалось, в РТ недалеко от пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) рибосомы располагается сайт специфического связывания антибиотиков-макролидов («macrolide-binding site», MBS). Он занимает примерно верхнюю треть РТ (см. также рис. 1). Функциональные группы некоторых макролидов и родственных им кетолидов достигают также стенок РТ в его суженной центральной части [59, 60]. Считается, что связываясь с MBS, антибиотики препятствуют росту полипептидной цепи на рибосоме.

Макролиды представляют собой семейство широко используемых в клинике и в ветеринарии природных, а также полусинтетических антибиотиков, построенных на основе 12–16-членных лактонов, к которым присоединены углеводные заместители (рис. 3) [61]. В частности, все макролиды имеют один и более углеводных остатков, связанных гликозидными связями с положением С5 лактонного кольца и направленных условно «вверх» по РТ, а некоторые – также остаток мицинозы в С14 положении лактонного кольца, который ориентирован вдоль стенок РТ в противоположном направлении, условно – «вниз» по РТ [59, 60, 62]. Сайты связывания различных макролидов не идентичны, хотя и сильно перекрываются [63].

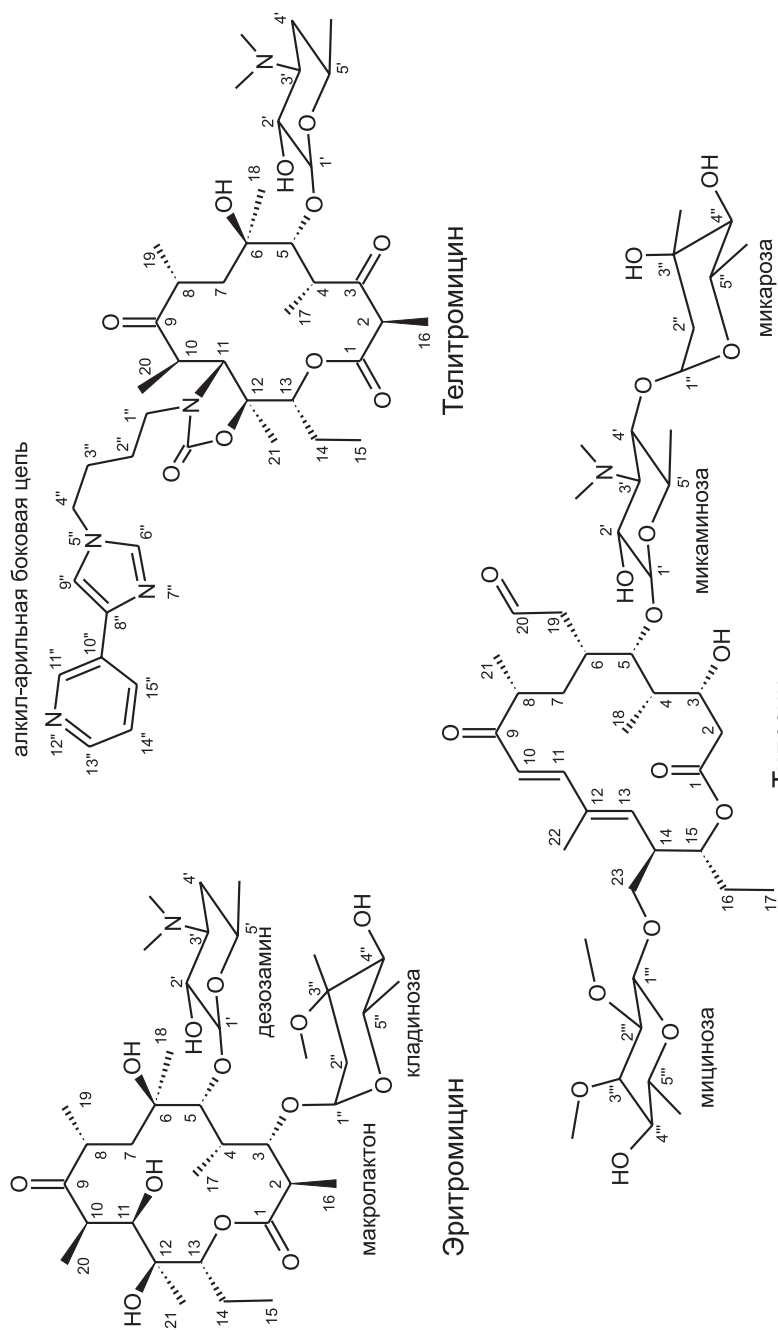


Рис. 3. Химическая структура представителей антибиотиков-макролидов (эритромицин, тилозин) и кетолидов (телитромицин).

Расположение MBS в большой субъединице рибосомы первоначально было определено с помощью биохимических и генетических методов исследования. При этом было установлено, что в формировании MBS принимают участие элементы центральной петли домена V и шпилька 35 домена II 23S рРНК [64]. Методом мутагенеза было показано, что все макролиды образуют, по крайней мере, один и тот же «точечный» контакт, а именно с нуклеотидом A2058 (здесь и везде в тексте, если это специально не оговаривается, нумерация нуклеотидных остатков дана для 23S рРНК *E. coli*), который находится в центральной петле домена V 23S рРНК [64, 65]. Метилирование аминокислотного остатка аденина в положении 2058 рРНК, осуществляемое метилтрансферазами Egm-типа [66, 67], а также замена A2058 на G, C или U приводит к значительному снижению аффинности рибосом к макролидам [68] и возникновению резистентности бактерий к этим антибиотикам. Метилирование A2058, скорее всего, стерически препятствует связыванию макролидов в MBS. Мутации соседних с A2058 нуклеотидов также приводят к резистентности бактерий к антибиотикам [69–71]. Кроме того, было найдено, что мутант с заменой G2032A более чувствителен к эритромицину, а делеции во II-ом домене рРНК снижают скорость роста бактериальных клеток в присутствии антибиотика [68]. Методом направленного мутагенеза установлено, что остатки C2611, G2057 (домен V), G748 (шпилька 35 домена II) [65], A752 (шпилька 35 домена II) [64], Lys90 (L4), Gly64 (L22) [38, 72] прямо или косвенно участвуют в формировании MBS.

Биохимические исследования, в частности, метод химического пробинга, подтвердили данные мутагенеза [62, 64, 71, 73–75]. Все макролиды защищают остатки A2058 и A2059 центральной петли домена V от химической модификации. Тилозин, десмикозин, карбомицин и спирамицин также препятствуют модификации остатка A2062 [30]. Кроме того, согласно данным химического пробинга, A2572 и U2609 также взаимодействуют с антибиотиками в РТ. Макролиды, имеющие два остатка сахара в положении 5 и углеводный остаток в положении 23 лактонного цикла (тилозин, карбомицин и спирамицин), связываются с нуклеотидами U2506 и A752 шпильки 35 домена II. На рис. 4 показана организация в пространственной и вторичной структуре 23S рРНК нуклеотидных остатков, вовлеченных в образование MBS.

Детальная картина связывания макролидов (карбомицина А, спирамицина, тилозина, азитромицина, эритромицина и др.) с РТ была получена с помощью РСА, когда были исследованы кристаллы

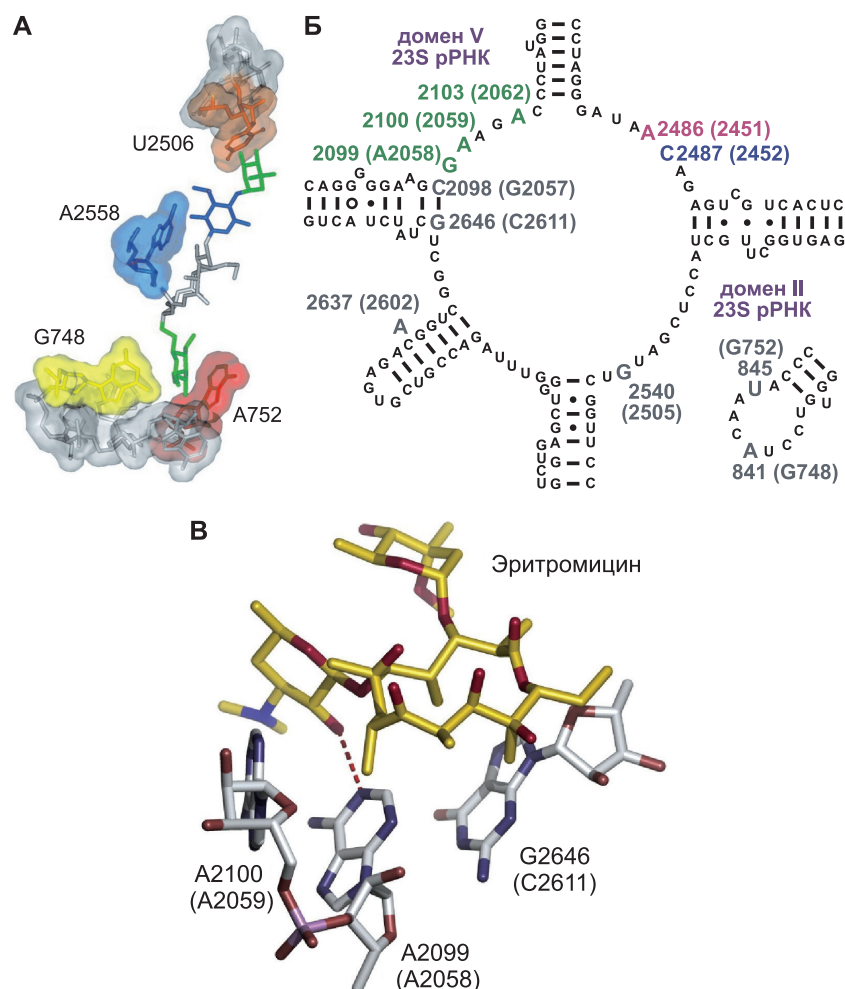


Рис. 4. Антибиотики-макролиды в рибосомном туннеле.

А. Расположение тилозина относительно наиболее важных нуклеотидных остатков 23S рРНК, формирующих сайт связывания макролидов. Адаптировано и модифицировано из [60].

Б. Положение нуклеотидных остатков 23S рРНК, формирующих сайт связывания макролидов, во вторичной структуре доменов II и V. Нумерация как в 23S рРНК *H. marismortui* (в скобках – номера соответствующих нуклеотидных остатков 23S рРНК *E. coli*).

В. Расположение молекулы эритромицина относительно соседних с ним нуклеотидных остатков 23S рРНК *H. marismortui* (в скобках – номера соответствующих нуклеотидных остатков 23S рРНК *E. coli*). Модель построена на основании данных PCA (индекс в PDB – 1YI2).

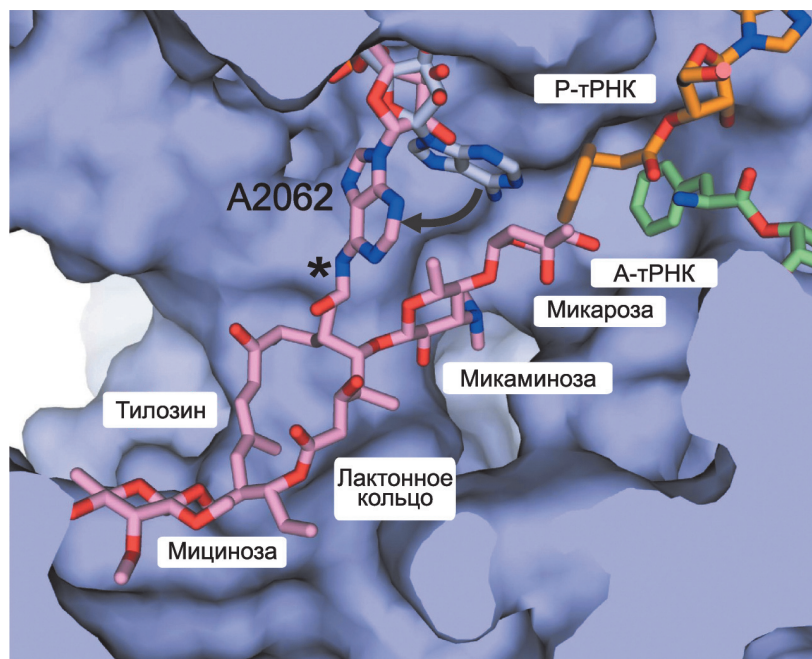


Рис. 5. Модель расположения тилозина в РТ, демонстрирующая образование ковалентной связи (показана звездочкой) между альдегидной группой тилозина и аминогруппой A2062. Стрелкой показан переход A2062 из «закрытой» в «открытую» конформацию, сопровождающий образование этой связи.

Адаптировано из [91].

их комплексов с большой субъединицей рибосомы *Haloarcula marismortui* и *Deinococcus radiodurans* [59, 60]. Хотя в целом данные РСА находятся в хорошем соответствии с полученными ранее результатами биохимических и генетических экспериментов, только с их помощью удалось установить точное расположение лактонных колец и углеводных остатков антибиотиков в РТ [76, 77]. РСА показал также, что в случае макролидов группы тилозина происходит обратимое образование ковалентной связи между альдегидной группой антибиотика в положении С6 лактонного кольца и N6-аминогруппой остатка A2062 23S рРНК, в результате чего лактонное кольцо заполняет просвет РТ (рис. 5). Стало ясно, что связывание макролидов в РТ осуществляется преимущественно за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Углеводные остатки играют важную роль в формировании контактов между молекулой антибиотика и стенками РТ, на их долю приходится 50–60%

общей поверхности молекулы, вовлеченной во взаимодействие. Соответственно, чем больше остатков сахаров связано с лактонным кольцом, тем сильнее взаимодействие между молекулой антибиотика и стенками РТ и тем выше его антибиотическая активность. Каждый углеводный остаток образует, по крайней мере, одну водородную связь с нуклеотидами рРНК. Так, ОН-группа остатка дезозамина (14–15-членных макролидов) и микаминозы (16-членных макролидов) (O2A) образует водородную связь с N1 A2058 (см. рис. 4В). Пара оснований C2611 и G2057 также может быть вовлечена в образование водородных связей с дезозамином [59], либо (рис. 4Б) стабилизировать гидрофобные взаимодействия лактона [60]. Кроме того, остаток дезозамина потенциально может взаимодействовать с фосфатным атомом кислорода G2505. Микароза образует водородную связь с остатком G2505 (G2540). Мициноза тилозина взаимодействует также с аминокислотными остатками рибосомного белка L22, а фурозамина спирамицина – белка L4. Что касается лактонных колец макролидов, то их конформация в РТ такова, что неполярные заместители находятся по одну сторону плоскости кольца, образуя неполярную поверхность; полярные заместители повернуты в противоположную сторону, формируя таким образом гидрофильную поверхность молекулы антибиотика. Из данных, полученных в этом цикле работ, также стало ясно, что в районе связывания макролидов на стенках РТ формируется гидрофобная поверхность благодаря тому, что гетероароматическое кольцо остатка C2611 (G2646) выступает в просвет РТ, а остаток A2058 (G2099A) участвует в стэкинг-взаимодействиях с G2057 (C2098). Конформация данного района 23S рРНК такова, что гетероциклические основания в нуклеотидах A2059 (A2100) и A2058 (G2099) не могут быть параллельны [78]. Образуется гидрофобная щель в стенке РТ, с которой взаимодействует лактонное кольцо макролида в положениях C4–C7 [78]. По данным РСА, стэкинг-взаимодействия должны также устанавливаться между реориентированным A2062 и гидрофобной поверхностью лактона.

В литературе дискутируется вопрос о том, действительно ли макролиды полностью закрывают просвет в РТ, тем самым блокируя проход растущей полипептидной цепи, или же макролид в туннеле представляет собой лишь помеху, приводящую к сужению туннеля в районе MBS, через оставшееся пространство которого растущая полипептидная цепь всё-таки может «протиснуться». Из данных работ [79, 80] можно сделать вывод о том, что способность макролидов блокировать прохождение растущей полипептидной цепи по туннелю не является абсолютной. Однако, даже если перекрытие туннеля этими антибиотиками осуществляется не в полной мере, они всё же

сильно затрудняют продвижение растущего пептида, активируя таким образом другие механизмы ареста трансляции белка (см. раздел V) и, что особенно важно, диссоциацию комплекса пептидил-тРНК с рибосомой [80].

Рентгеноструктурный анализ комплексов рибосом с макролидами во многом прояснил молекулярные причины появления у бактерий устойчивости к этим антибиотикам. Ранее было показано, что резистентность бактерий к макролидам возникает в результате метилирования 23S рРНК (чаще всего, это моно- и диметилирование N6-аминогруппы нуклеотида A2058, а также метилирование других пуриновых нуклеотидов доменов II и V 23S рРНК). Известно около 20 генов *erm* (erythromycin ribosome methylation), кодирующих фермент метилтрансферазу, они ассоциированы с транспозонами и могут локализоваться как на плазмидах, так и на хромосомах. Эти метилазы широко распространены среди аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий [70, 81, 82]. Метилирование мишени действия макролидов обуславливает высокий уровень их устойчивости к этим антибиотикам (см, например, [83]). Моно- и диметилирование остатков A2058 и G748 вызывает формирование резистентности фактически ко всем макролидам, так как эти остатки участвуют в образовании противоположных друг другу районов стенок РТ, и модификации одновременно по обоим остаткам нарушают образование водородных связей между нуклеотидами и молекулой антибиотика [65, 84]. Снижение чувствительности к макролидам штаммов *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *S. oralis* вызывает также мутации в генах рибосомных белков L4 и L22. Чаще всего происходит замена нуклеотида A2062 на C, реже – на другие нуклеотиды, не имеющие свободной аминогруппы, ориентированной нужным для связывания с антибиотиками образом. В частности, в случае макролидов тилозиновой группы это приводит к потере возможности образовывать ковалентную связь по альдегидной группе. Замена остатка A2058 на G [85] делает менее гидрофобной контактную поверхность нуклеотидов РТ в сайте связывания макролидов, так что взаимодействие с гидрофобной поверхностью лактонного кольца нарушается.

Несмотря на то, что на многие вопросы, касающиеся механизма подавления трансляции макролидами, ответы еще не получены [86], расшифровка структуры их комплексов с РТ, уже принесла ощутимые практические плоды: на базе этих знаний удалось сконструировать принципиально новые ингибиторы биосинтеза белка у бактерий, способные преодолевать устойчивость патогенов к применяемым ныне в клинике антибиотикам (см. для обзора [58]). Полученные в

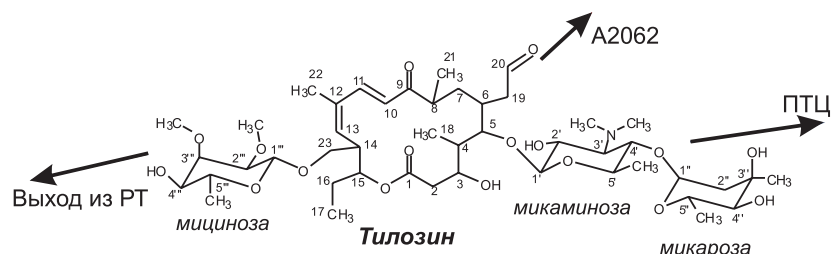


Рис. 6. Модификация тилозина аминокислотными и пептидными остатками (стрелками показаны положения, по которым проводилась модификация) (см. подробности в тексте).

этих исследованиях данные также чрезвычайно важны для идентификации районов РТ и конкретных функциональных групп рРНК и белков, которые могут взаимодействовать с растущим пептидом, модулируя и стабилизируя его конформацию в туннеле, а также его участие в аресте трансляции. Здесь мы прежде всего должны выделить практически все нуклеотидные остатки домена V рРНК большой субъединицы рибосомы, выступающие стенки верхней трети РТ; нуклеотидные остатки петли спиральной шпильки 35 (домен II), расположенные рядом с сужением РТ, и ряд аминокислотных остатков вершин β -петель белков L4 и L22, которые формируют это сужение. К сожалению, на сегодня известно только одно рентгеноструктурное исследование комплекса рибосомы с антибиотиком (негамицином), связывающимся с участком РТ, расположенным недалеко от выхода из туннеля [87]. В принципе, оно представляет большой интерес, поскольку негамицин можно рассматривать как аналог пептида. Однако этот комплекс изучен пока с недостаточно высоким разрешением.

Базируясь на информации, полученной в ходе РСА-анализа комплексов антибиотиков с рибосомой, авторы настоящей обзорной статьи синтезировали аминокислотные и пептидные производные макролидов, которые оказались полезными инструментами для моделирования поведения растущего пептида в РТ. Основная идея этих исследований заключалась в использовании макролидов тилозиновой группы в качестве «якорных» молекул, которые несли остатки аминокислот или коротких пептидов (рис. 6) [88]. При этом лактонные кольца и углеводные остатки антибиотиков модифицировали таким образом, чтобы аминокислотные или пептидные остатки могли непосредственно контактировать с потенциальными сайтами взаимодействия растущего пептида с РТ [89, 90]. Изучалось связывание этих соединений с рибосомой и их способность ингибировать синтез белка в бесклеточной системе. Кроме того,

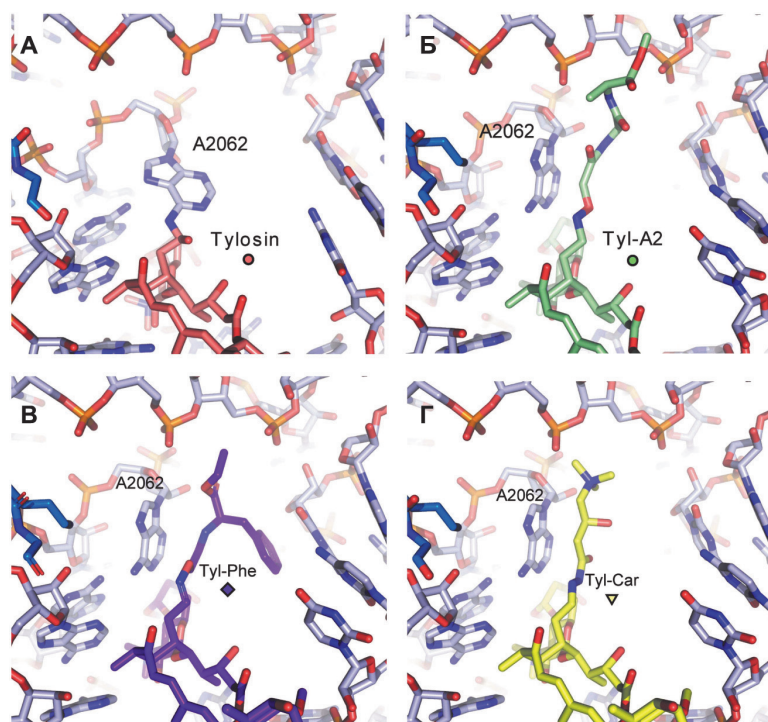


Рис. 7. Молекулярные модели тилозина и его производных по C20 в «адениновом кармане» РТ.

А. Тилозин, ковалентно связанный с A2062. Модель построена на основании данных PCA (индекс в PDB – 1K9M).

Б. C20-аланилаланил–тилозин. Модель построена на основании данных PCA [57, 91].

В. C20-фенилаланил–тилозин. Ароматическое кольцо фенилаланина находится в стэкинг-взаимодействии с C2586 [91].

Г. C20-карнитил–тилозин. Положительно заряженный остаток аминокислоты образует ионную пару с фосфатной группой сахаро-фосфатного остова 23S рРНК [91].

структура аланилаланинового производного тилозина по положению C20 была исследована методом PCA (рис. 7Б) [91]. Было показано, что полость в РТ, образуемая при переходе нуклеотидного остатка A2062 из открытой конформации в закрытую (более подробно об этом конформационном переходе см. в следующем разделе) может служить для взаимодействия с гидрофобными (рис. 7В) и положительно заряженными (рис. 7Г) остатками растущей цепи белка. Продемонстрировано также, что ансамбль, образуемый остатком

A752 и его окружением, с одной стороны, и остатком Arg92 белка L22, с другой стороны, может служить центром связывания боковых цепей ароматических аминокислот растущей цепи (А.В.Шишкина, неопубликованные данные).

V. УЧАСТИЕ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Как уже отмечалось, РТ должен обеспечивать беспрепятственное перемещение растущей цепи белка в теле рибосомы. В ранних работах даже возник не вполне удачный образ РТ как пассивного «тефлоно-подобного туннеля». Однако еще до того, как было доказано, что РТ является проводником синтезируемых рибосомой цепей белка, было известно, что в ряде особых случаев вновь образованная полипептидная цепь вступает в сильные взаимодействия с рибосомой, что приводит к остановке (аресту) трансляции [92–94]. Впоследствии было установлено, что остановка трансляции лежит в основе механизмов регуляции экспрессии некоторых генов, в том числе отвечающих за секрецию [95], аминокислотный метаболизм [96], устойчивость к антибиотикам [97]. Обычно арест трансляции происходит на стадии элонгации или терминации и распространяется только на те рибосомы, которые уже заняты в синтезе белка. Как правило, роль «стоп-пептидов» выполняют т.н. лидерные полипептиды, закодированные в 5'-концевом районе оперона. Соответственно, остановка их трансляции в РТ регулирует экспрессию генов, расположенных «вниз по течению» (down-stream) относительно лидерной последовательности.

В генах, экспрессия которых регулируется через остановку трансляции, закодированы мРНК, обладающие уникальной вторичной структурой, которая перестраивается так, как этого и требует классический механизм аттенюации транскрипции. В каждом случае сайт связывания с рибосомой для последовательности, кодирующей устойчивость к лекарственным препаратам, находится внутри одной из двух инвертированных повторяющихся последовательностей. Следовательно, в транскриптах этот сайт будет включен в стабильную структуру шпильки, которая препятствует трансляции. Лидерная последовательность, кодирующая короткий регуляторный пептид, расположена «выше» (up-stream) этой структуры [92].

В большинстве известных случаев «стоп-пептиды» ингибируют трансляцию в сочетании со специфическими низкомолекулярными кофакторами. Так, например, уровень синтеза карбамоилфос-

фат-синтетазы грибов регулируется коротким «стоп-пептидом», закодированным в 5'-концевой области его гена. При этом арест трансляции и снижение уровня синтеза фермента происходит при возрастании концентрации аргинина в клетке [98]. Аналогичная картина наблюдается для S-аденозилметионин-декарбоксилазы животных. В этом случае эффектором служит спермидин [99]. Ниже мы опишем наиболее важные примеры регуляции экспрессии генетической информации, в которых РТ принимает непосредственное участие, и рассмотрим возможную природу узнавания рибосомой аминокислотной последовательности растущего регуляторного полипептида.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *cat* И *clmA*

Одним из первых указаний на то, что экспрессию некоторых генов контролируют специфические пептиды, было обнаружение того факта, что у зубактерий два индуцибельных гена устойчивости к хлорамфениколу регулируются с помощью классического механизма аттенуации транскрипции. Ловет и сотр. показали, что основной этап аттенуации транскрипции – временная остановка рибосомы – вызван ингибированием пептидилтрансферазной активности короткими пептидами (5–8 аминокислотных остатков), представляющими собой N-концевые части полипептидов, закодированных в лидирующей последовательности регулируемых генов. Короткие пептиды влияют на активность ПТЦ кооперативно с индуктором – хлорамфениколом – и действуют исключительно *in cis* [92, 100]. Ингибирование пептидилтрансферазной активности зависит от первичной структуры пептида. Исходя из этих фактов, авторы предположили, что *cis*-действующие регуляторные пептиды должны быть специфически связаны с каким-то элементом рибосомы, ассоциированным с ПТЦ. Поскольку растущие пептиды, с которыми имели дело авторы, конкурировали за сайт связывания с эритромицином [101], нет сомнений в том, что их мишень была расположена в РТ.

Известно, что за индуцируемую устойчивость к хлорамфениколу в грамположительных бактериях отвечают гены *cat* и *clmA*. В обеих системах сайт связывания с рибосомой маскирован во вторичной структуре РНК, и инициация трансляции практически невозможна. Хлорамфеникол индуцирует экспрессию *cat* и *clmA*, затормаживая рибосому в определенном месте транслируемой лидирующей последовательности, которая предшествует этому элементу вторичной структуры.

В случае генов *cat* заметная индукция происходит только тогда, когда рибосома останавливается на 6-ом кодоне лидирующей после-

довательности. В случае *cmlA* активация трансляции происходит за счет становки рибосомы на 9-ом кодоне. Хлорамфеникол – индуктор экспрессии генов *cat* и *cmlA* – ингибирует элонгацию трансляции на случайно выбранных сайтах и не способен обеспечить сайт-специфическое затормаживание рибосомы. Специфичность ареста трансляции здесь обеспечивается кодонами лидирующей последовательности, которые предшествуют сайту остановки рибосомы и кодируют пентапептид в случае гена *cat* и октапептид – в случае *cmlA*, ингибирующие активность ПТЦ [102].

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ermC*

В гене *ermC* закодирован фермент метилтрансфераза *Erm* типа. Этот фермент метилирует аминокислотную группу A2058 в 23S рРНК, что, как указывалось выше, приводит к устойчивости рибосомы к нескольким классам антибиотиков, включая макролиды [103]. У *Staphylococcus aureus* экспрессия этого гена регулируется «стоп-пептидом», закодированным в лидерной последовательности (19 кодонов), расположенной на расстоянии 65 нуклеотидных остатков перед началом *ermC*. В отсутствие антибиотиков происходит конститутивная трансляция лидерной последовательности. При этом мРНК белка *ErmC* не транслируется, т.к. сайт связывания с рибосомой экранирован в ее вторичной структуре. В присутствии антибиотика синтез лидерного пептида останавливается на 9-ом кодоне, вторичная структура мРНК перестраивается таким образом, что сайт инициации трансляции белка *ErmC* становится доступным для рибосомы, и его синтез протекает беспрепятственно [104].

Молекулярный механизм индукции экспрессии гена *ermC* антибиотиком эритромицином был детально изучен Манькиным и соотр. [97]. Было показано, что при аресте рибосомы 9-членный «стоп-пептид» связан с тРНК, находящейся в Р-сайте рибосомы; С-концевая тетрапептидная последовательность IFVI «стоп-пептида» критична для эффективной индукции, причем замена находящегося в ПТЦ Ile9 даже на структурно близкий остаток Val ее элиминирует; в арестованной рибосоме находится не только «стоп-пептид», но и эритромицин; нуклеотидный остаток A2062 критичен для процесса индукции: у мутантов, где он заменен на С или U, индукция *ermC* эритромицином практически не наблюдается; и наконец, при совместном размещении «стоп-пептида» и эритромицина в РТ происходит инактивация ПТЦ (хотя сам эритромицин пептидилтрансферазную реакцию не ингибирует) [97]. Предполагаемая структура комплекса показана на рис. 8. Авторы предположили, что при образовании такого комплекса происходит переход A2062 из «открытой» конформации (когда гете-

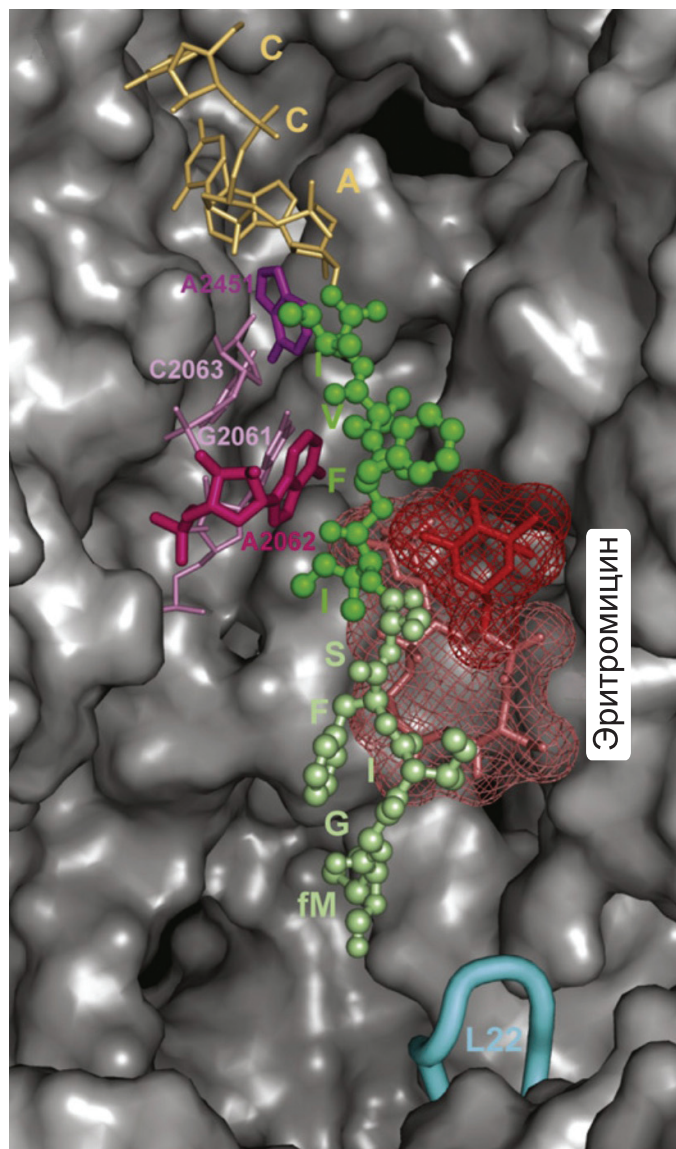


Рис. 8. Взаимодействие эритромицина со «стоп-пептидом» ermC. Компьютерная модель.

Темно-зеленым цветом обозначена С-концевая последовательность ermC, абсолютно необходимая для ареста трансляции.

Адаптировано из [79].

роциклическое основание «смотрит» в открытое пространство РТ) в «закрытую» (когда кольцо аденина ориентировано вдоль стенки РТ). Аналогичный конформационный переход наблюдался при связывании в РТ аминокислотных и пептидных производных тилозина (см. раздел IV) [91]. Манькин и сотр. предположили, что изменение конформации A2062 модулирует структурные превращения в ПТЦ рибосомы, которые ведут к его инактивации [97].

Действительно, в кристаллической структуре 50S субъединицы рибосомы, не связанной с субстратами, триада из нуклеотидных остатков G2061–A2062–C2063 образует весьма необычную структуру: G2061 фактически интеркалирован между A2062 и C2063; G2061 и C2063, фланкирующие A2062, направлены непосредственно в активный сайт ПТЦ. Остаток G2061 образует водородную связь с A2451 – одним из ключевых элементов ПТЦ. Остаток C2063 также связан с элементами ПТЦ, а именно с остатком A2450 с помощью водородных связей [12]. Мутации любого из этих остатков (G2061, C2063, A2450 или A2451) являются критичными для функционирования рибосомы, делая её совершенно неактивной [105]. Таким образом, остаток A2062 связан с активным сайтом ПТЦ через систему межнуклеотидных взаимодействий, поэтому движение этого остатка, по-видимому, действительно приводит к структурным изменениям в ПТЦ, что напрямую сказывается на функционировании рибосомы. Вполне вероятно, что остаток A2062 может быть вовлечен в мониторинг растущей пептидной цепи и передачу сигналов из РТ в ПТЦ, приводящих к изменению уровня трансляции [97].

«СТОП-ПЕПТИД» SecM И РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *secA*

Белок SecA играет важную роль в секреции и транспорте через мембраны белков *E. coli* [94, 106]. Экспрессия гена *secA* в *E. coli* регулируется его лидерным участком, содержащим открытую рамку считывания (ОРС), в которой закодирован белок secM (170 кодонов). Когда на лидерной мРНК сайт связывания рибосомы доступен, подобный сайт на участке *secA* вовлечен в образование вторичной структуры мРНК, что препятствует инициации синтеза SecA. Происходит инициация трансляции и полимеризация первых 165 аминокислот до тех пор, пока в Р-сайт не попадет Gly-тРНК, соответствующая кодону Gly165, на котором рибосома останавливается. Полипептидная цепь SecM содержит сигнальную последовательность на N-конце, и если аппарат секреции белков в клетке работает нормально, то N-концевая часть пептида SecM будет выведена из туннеля, что повлечет за собой высвобождение рибосомы из арестованного состояния с помощью

SRP. В этом случае активации экспрессии гена *secA* не происходит. Ключевой момент работы этой системы заключается в том, что арест рибосомы происходит при недостатке SecA в клетке, т.е. в условиях нарушения секреции белков. Рибосома останавливается на 165 кодоне *secM*, в результате чего вторичная структура мРНК перестраивается, и другая рибосома осуществляет трансляцию той ее части, в которой закодирован белок SecA [94].

Накатагава и Ито с помощью мутационного анализа установили, что арест рибосомы на ОРС *secM* обусловлен последовательностью С-концевого участка растущего полипептида $F_{150}XXXXWIXXXGIRAGP_{166}$, где «X» означает положения в полипептидной цепи, которые могут быть заменены на остатки аланина без нарушения «стоп-функции» SecM [94]. Критическими для остановки являются остатки Phe150, Trp155 и Ile156, наряду с шестью С-концевыми аминокислотными остатками $GIRAGP_{166}$. Расстояние между этими важными остатками также существенно [107]. То, что арест трансляции вызван попаданием в РТ именно указанной выше последовательности, было доказано включением кодирующих ее сегментов гена *secM* в гены других белков, что приводило к существенному снижению уровня их экспрессии [104]. Как уже отмечалось, в арестованном комплексе растущий пептид присоединен к тРНК^{Gly}, расположенной в Р-сайте рибосомы [104]. Необходимо отметить, однако, что остаток пролина, доставленный аминоацил-тРНК в А-сайт в соответствии с кодоном 166, также является абсолютно необходимым для ареста трансляции. Иными словами, в этой системе Pro-тРНК выполняет роль эффектора ареста трансляции. Одновременное присутствие пептидил-тРНК в Р-сайте и аминоацил-тРНК в А-сайте арестованной рибосомы свидетельствует о том, что остановка трансляции вызвана неспособностью рибосомы катализировать образование пептидной связи между Gly165 и Pro166. По крайней мере, одна из причин этого явления заключается в том, что остаток пролина (в силу своей уникальной в ряду белковых аминокислот структуры и низкой нуклеофильности) служит плохим субстратом, как для А-, так и для Р-сайта рибосомы. В случае А-сайта, это можно проиллюстрировать тем фактом, что ацилированная пролином фенилаланиновая тРНК реагирует с fMet-тРНК на несколько порядков медленнее, чем Phe-тРНК [108]. В случае Р-сайта известно, что пептидил-тРНК, расположенная в этом сайте, пептидный остаток которой несет на С-конце пролин, плохо реагирует с пуромицином [109, 110].

Особая роль остатка пролина, находящегося на С-конце растущего пептида, который, будучи расположенным в РТ, вызывает арест трансляции, достаточно детально исследовалась в случае белка YbeL, также способного вызывать арест трансляции [111]. Систематический мутационный анализ С-концевой части YbeL показал, что замена С-концевого Pro аминокислотами различных типов приводит к нормальной терминации трансляции. Аминокислотный остаток в следующем от С-концевого пролина положении (–2) также оказывается важным для эффективности связывания тмРНК. Например, замещение Glu (–2) в белке YbeL дикого типа на Arg, Asn, Leu, Trp, Cys, His, Thr и Met сильно увеличивает эффективность остановки трансляции; на эффективности ареста трансляции сказываются также и некоторые замены в положении –3. Таким образом, присутствие Pro на С-конце растущего пептида необходимо, но недостаточно для ингибирования реакции отщепления пептидил-тРНК. Некоторые аминокислотные остатки растущего пептида, расположенные внутри РТ, также вносят вклад в этот процесс [112].

Интересно, что хотя в аминокислотной последовательности известных на сегодня «стоп-пептидов» и не удастся обнаружить заметного сходства, их С-концы чаще всего представлены пролином. Это особенно отчетливо было недавно показано Баскиром и сотр. [113], которые разработали остроумную схему скрининга последовательностей «стоп-пептидов» в пептидном банке, содержащем огромный набор коротких пептидов. Их схема селекции таких пептидов основана на использовании естественной системы бактериальной клетки и ее ключевого компонента – транспортно-матричной РНК (тмРНК), с помощью которых она преодолевает арест трансляции и уничтожает недостроенные (дефектные) белки [114]. Матричный участок тмРНК был изменен таким образом, что он обеспечивал достраивание белка, от которого зависело выживание бактериальной клетки в присутствии антибиотика канамицина. На С-конец недостроенного белка встраивалась пептидная библиотека. Те компоненты библиотеки, которые обеспечивали арест трансляции, в конечном итоге, и позволяли отобрать устойчивые к канамицину клетки. Авторы идентифицировали три класса «стоп-пептидов»: 1) с разнообразными последовательностями, но обязательным С-концевым пролином; 2) подобные С-концевому участку SecM; 3) новый тип пептида с последовательностью FXXYXIWPP (где X –любой аминокислотный остаток) [113].

Еще один фактор, который важен для эффективного ареста трансляции «стоп-пептидом» белка SecM, это его конформация в

РТ. Когда рибосома синтезирует необходимую для ареста трансляции последовательность SecM, некоторые ее участки уже в ходе синтеза принимают более компактную, чем полностью развернутая, конформацию (в некоторых частях, возможно, α -спиральную) [115]. Этот факт был установлен Джонсоном и сотр. с помощью метода FRET. Они показали, что отсутствие такой компактизации С-концевого участка «стоп-последовательности», непосредственно примыкающего к ПТЦ (степень компактизации можно было регулировать, заменяя определенные аминокислотные остатки в SecM), либо делает арест трансляции менее эффективным, либо вовсе устраняет его [115]. Авторы полагают, что особая конформация необходима для пространственного совмещения ключевых аминокислотных остатков SecM с сенсорными элементами РТ.

Недавно Яп и Бернстайн в ходе детального генетического анализа SecM получили убедительное подтверждение этого предположения [116]. Изучая мутации в SecM, которые супрессируют его способность останавливать трансляцию, а также сравнивая аминокислотные последовательности SecM, закодированные в геномах множества других эубактерий, они пришли к выводу, что только остатки R163 и Pro166 абсолютно необходимы для ареста процесса элонгации синтеза этого белка. Другие выявленные ранее [94,107] важные для выполнения этой функции аминокислотные остатки SecM создают такую конформацию его полипептидной цепи в РТ, которая необходима для закрепления R163 напротив его специфического сайта на стенке туннеля. Вопрос о том, какой из нуклеотидных остатков 23S рРНК мог бы быть этим сайтом, авторы не обсуждают.

В связи с этим можно отметить следующее. Ранее, анализируя результаты PCA комплексов 50S субъединицы рибосом *Haloarcula marismortui* с аналогами аминоацил- и пептидил-тРНК [117, 118] мы обратили внимание, в частности, на то, что атом кислорода в карбонильной группе пептидной связи между С-концевым и следующим за ним аминокислотными остатками в посттранслокационном комплексе (аналог пептидил-тРНК находится в Р-сайте) образует водородную связь с экзациклической группой G2061 [119]. Было высказано предположение, что эта связь стабилизирует конформацию начального звена растущей полипептидной цепи в РТ. Если это предположение верно, то в случае ареста трансляции с помощью SecM, G2061 будет взаимодействовать с пептидным остовом звена Ala164–Gly165. При этом, весьма вероятно, что положительно заряженная боковая цепь ключевого остатка R163 займет место в «адениновом кармане», образованном A2062 и его окружением. Образование подобного

комплекса наблюдалось в случае карнитинового производного тилозина (см. главу IV и рис. 7Г). Другая возможность заключается в образовании между положительно заряженной группой аргинина и гетероциклическим основанием в A2062 т.н. «катион- π »-комплекса (о комплексах этого типа более подробно см. в следующем разделе). В пользу обоих предположений говорит тот факт, что мутации по A2062 лишают SecM способности останавливать трансляцию (Vazquez-Laslop, N., Mankin, A.S., личное сообщение). Однако выбор между альтернативными механизмами, по-видимому, можно сделать только с помощью PCA комплекса 50S субъединицы рибосомы с SecM в ее туннеле.

УЧАСТИЕ ЛИДЕРНОГО ПЕПТИДА TnaC В РЕГУЛЯЦИИ ТРИПТОФАНАЗНОГО ОПЕРОНА

Многие бактерии способны расщеплять триптофан и использовать продукты его деградации для своей жизнедеятельности. Например, в *E. coli* индол, образующийся из триптофана, служит сигнальным компонентом в процессах т.н. «кворум сенсинга», формирования биопленок и регуляции экспрессии некоторых генов [110–122]. Основным ферментом катаболизма триптофана в грамотрицательных бактериях служит триптофаназа, которая расщепляет триптофан до индола, пирувата и аммиака, в результате чего триптофан становится источником углерода и азота в клетке [123]. Триптофаназный (*tna*) оперон *E. coli* состоит из транскрибируемой лидирующей регуляторной последовательности (320 п.о.), за которой следуют два структурных гена *tnaA* и *tnaB*. В лидерной последовательности закодирован 24-звенный регуляторный –«стоп-пептид» TnaC; *tnaA* кодирует триптофаназу, а *tnaB* – триптофан-пермеазу. Транскрипция структурных генов начинается при условии терминирования транскрипции с участием Rho-фактора на сайтах остановки транскрипции, расположенных сразу за *tnaC*. Действие Rho-фактора предотвращается высокими концентрациями триптофана. Индукция триптофаном требует синтеза пептида TnaC, который содержит необходимый остаток триптофана в положении 12 [124]. Было показано, что индукция происходит благодаря ингибированию триптофаном активности фактора терминирования RF2 на стоп-кодоне *tnaC* [125].

В лидерном транскрипте оперона *tna* выделяют три района, существенных для регуляции его экспрессии свободным триптофаном: последовательность, кодирующую TnaC; сайт связывания фактора терминирования Rho и РНК-сайты, необходимые для Rho-зависимой терминирования транскрипции. Эти сайты предшествуют двум структурным генам оперона *tnaA* и *tnaB*. Предполагается, что лидерный

пептид TnaC регулирует действие Rho следующим образом: в процессе трансляции он передает рибосоме сигнал связать свободный триптофан, вследствие чего ингибируется отщепление TnaC-тРНК^{Pro}, а это, в свою очередь, вызывает остановку рибосомы на стоп-кодоне tnaC. Такая остановленная рибосома блокирует сайт связывания Rho-фактора (rut-сайт) и тем самым предотвращает связывание Rho-фактора с транскриптом и терминацию транскрипции. В том случае, когда Rho не имеет возможности проявить свою активность, РНК-полимераза, остановленная после лидерного участка, возобновляет процесс транскрипции, перемещаясь на структурные гены оперона [126].

Если в клетках концентрация триптофана ниже необходимой для индукции, рибосома завершает синтез пептида TnaC, происходит расщепление TnaC-пептидил-тРНК, и рибосома освобождается. Это приводит к тому, что rut-сайт в лидерной РНК имеет возможность связаться с Rho-фактором, который в этом случае контактирует с РНК-полимеразой, остановленной на лидерном участке РНК, и осуществляет терминацию транскрипции. Регуляторный район tna оперона *E. coli* довольно схож с регуляторными районами этого оперона у некоторых других видов бактерий [126]. Когда клетки выращиваются в среде, лишенной катаболитного репрессора, белок CAP активирован, и происходит инициация транскрипции tna оперона [127].

Исследования, проводимые лабораторией Яновского, в течение длительного времени были направлены на определение того, каким образом стенки РТ узнают остаток Trp12 растущей цепи, и как это узнавание приводит к образованию сайта связывания свободного триптофана на рибосоме. Приблизительное расположение важнейшего остатка Trp12 в TnaC-тРНК^{Pro} в 50S субчастице рибосомы определено в экспериментах, показывающих, что остаток Lys11 в TnaC-тРНК^{Pro} может быть ковалентно сшит с A750 23S рРНК, и что Trp12 в TnaC-тРНК^{Pro} «защищает» от метилирования основание A788 в 23S рРНК [127]. Кроме того, было найдено, что некоторые нуклеотиды 23S рРНК и один из остатков рибосомного белка L22 являются необходимыми для индукции триптофаном и участвуют в формировании регуляторного района в рибосомном туннеле – сайта связывания Trp12 TnaC-тРНК^{Pro}. Предположительно, этими важными остатками являются U2609 и A752 23S рРНК и K90 белка L22. Авторы делают вывод, что участок связывания свободного триптофана находится в районе А-сайта ПТЦ, и это взаимодействие ингибирует гидролиз аминокислотной связи в TnaC-тРНК^{Pro}, катализируемое фактором терминации [124]. В экспериментах с рибосомами дикого типа, в РТ которых находился TnaC-тРНК^{Pro}, было обнаружено, что

свободный триптофан ингибирует связывание в А-сайте пурамицина и спарсомидина. Однако при наличии мутаций по одному из трех существенных оснований 23S рРНК, о которых говорилось выше, свободный триптофан более не ингибирует ни пурамициновую реакцию, ни связывание спарсомидина [128]. Приведенные здесь факты позволяют предположить, что, связываясь с А-сайтом ПТЦ, свободный триптофан индуцирует структурные изменения в этом функциональном центре рибосомы [129].

Остаток триптофана, находящийся в 12-ом положении TnaC, абсолютно необходим для индукции tna оперона свободным триптофаном. Индукция не происходит при замещении Trp12 на аргинин, удалении Trp12 из пептидной цепи делецией соответствующего кодона или включением аминокислотных остатков между Trp12 и С-концевым Pro (Pro24). В то же время, замена некоторых аминокислотных остатков между Trp12 и Pro24, делеции и вставки в N-концевой области TnaC практически не изменяют уровня индукции. Pro24 также абсолютно необходим для того, чтобы, во-первых, TnaC функционировал как «стоп-пептид», а во-вторых, чтобы свободный триптофан мог быть индуктором триптофаназного оперона [130].

Итак, можно было заключить, что бактериальные рибосомы содержат специфический сайт для взаимодействия с остатком триптофана растущего пептида. Расстояние от этого сайта до начала туннеля должно было составлять 35–40 Å, поскольку Trp12 является 13-м аминокислотным остатком от С-конца пептида TnaC. Таким образом, предполагалось, что сайт связывания триптофана находится в средней части РТ в районе его сужения. Предполагалось также, что связывание Trp12 со своим специфическим центром на стенке РТ служит сигналом для формирования участка связывания индуктора (свободного триптофана) в районе А-сайта ПТЦ и что связывание индуктора с этим участком вызывает изменения в ПТЦ, предотвращающие расщепление TnaC-пептидил-тРНК^{Pro} [130, 131].

Большая часть из этих предположений подтвердилась, когда удалось исследовать комплекс рибосомы *E. coli* с TnaC методом высокоразрешающей КЭМ [46]. Оказалось что этот «стоп-пептид» находится в РТ в развернутой, но вполне определенной конформации, благодаря тому, что он образует многочисленные слабые контакты со стенками туннеля. При этом Trp12 действительно располагается в суженной части туннеля, причем напротив него на стенке туннеля находится остаток Arg92 белка L22, а поблизости от него находится нуклеотидный остаток A751 (рис. 9). Используя результаты ингибирования бесклеточной системы трансляции описанными выше пептидными

производными макролидов (среди которых были соединения, содержащие триптофан) и компьютерное моделирование, мы нашли, что ароматическое кольцо остатка триптофана в TnaC может интеркалировать между положительно заряженной боковой группой Arg92 и адениновым основанием A751 (А.В.Головин, А.А.Богданов, неопубликованные данные) (рис. 10). Такой комплекс стабилизируется не только хорошо известными гидрофобными стэкинг-взаимодействиями, но и «катион- π » взаимодействием Arg с Trp. Последний тип межмолекулярных взаимодействий в белках и их комплексах с нуклеиновыми кислотами интенсивно изучается в последние годы (см, например, [132]). Возможность контакта Arg92 с Trp 12 в TnaC за счет «катион- π » взаимодействий была недавно продемонстрирована Трабуко и др. [133] методом квантово-механических расчетов (молекулярной динамики). Эти же авторы описали еще один важный контакт между TnaC и стенками РТ, а именно образование ионной пары между остатком K90 в белке L22 и Asp16 в TnaC. Высокая вероятность такого контакта базируется не только на биохимических и генетических данных [130], но и на том факте, что последний аминокислотный остаток полностью консервативен у всех бактериальных аналогов TnaC [126].

Небходимо отметить, что КЭМ-анализ комплекса TnaC с рибосомой дал еще один очень важный результат: было обнаружено, что связывание этого «стоп-пептида» с РТ вызывает серьезные конформационные изменения как раз той части ПТЦ, которая ответственна за терминацию трансляции [46].

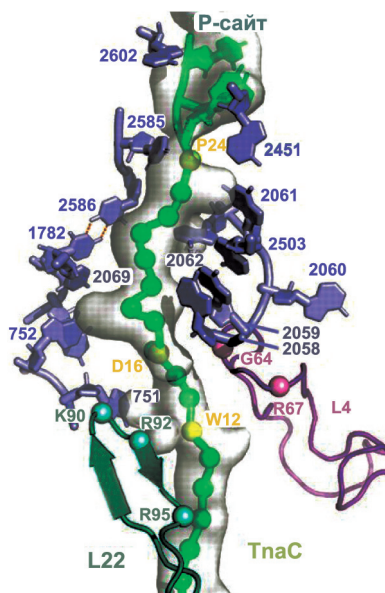


Рис. 9. Лидерный пептид TnaC в туннеле рибосомы *E. coli*.

Модель построена на основании данных высокоразрешающей КЭМ [46]. Желтым показаны аминокислотные остатки, играющие ключевую роль в аресте трансляции. Жирным выделены номера нуклеотидных и аминокислотных остатков, мутации по которым нарушают арест трансляции.

Адаптировано и модифицировано из [46].

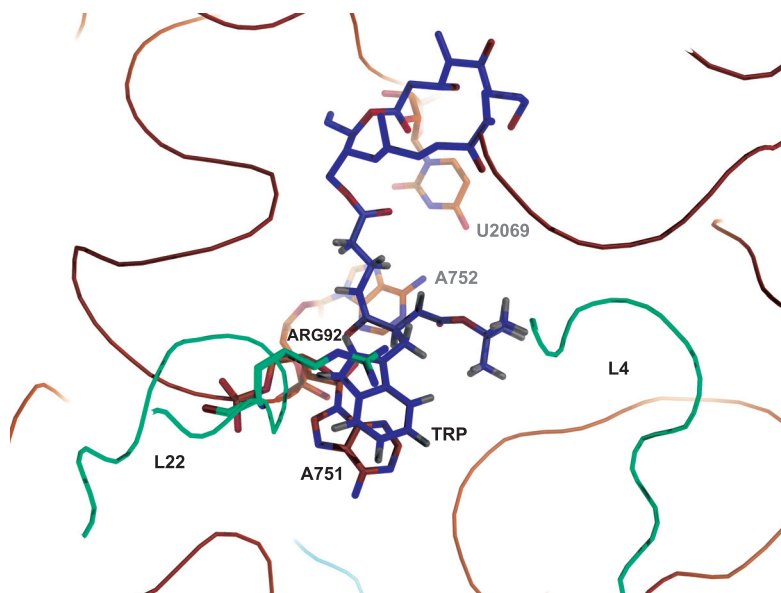


Рис. 10. Компьютерная модель, иллюстрирующая возможное связывание остатка Trp12 лидерного пептида TnaC с триптофан-связывающим центром 50S субъединицы рибосомы.

Для построения модели использовали производное макролида тилозиновой группы (ОМТ), в котором остаток триптофана был связан с лактонным кольцом ОМТ «мостиком» соответствующей длины. Положение лактонного кольца в РТ в точности соответствует таковому в комплексе тилозина с 50S субъединицей Н (индекс в PDB – 1K9M). Видно, что ароматическое кольцо триптофана интеркалировано между положительно заряженной группой аргинина и кольцом аденина в А751.

Модель построена и любезно предоставлена А.В.Головиным.

В заключение этого раздела, сравнивая связывание SecM и TnaC с РТ, нельзя не заметить, что, несмотря на отсутствие сходства в их аминокислотных последовательностях, в основе механизмов ареста трансляции этими пептидами лежат одинаковые принципы. Во-первых, в А- или Р-сайте ПТЦ должен находиться остаток пролина. Во-вторых, для остановки продвижения полипептидной цепи по РТ достаточно всего одного-двух сильных контактов с его стенками, которые зависят от вторичной структуры пептида. В-третьих, информация об этих контактах должна быть каким-то образом передана в ПТЦ, где формируется сайт связывания эффектора (индуктора).

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря интенсивным исследованиям последнего десятилетия, рибосомный туннель превратился из достаточно призрачного элемента структуры рибосомы, в существование которого верили далеко не все, в объект пристального внимания молекулярных биологов. Изучение его комплексов с антибиотиками существенно ускорило создание антибактериальных препаратов нового поколения. Анализ комплексов РТ с пептидами, способными останавливать трансляцию, по сути дела, привел к открытию новых способов регуляции экспрессии генетической информации. И в то же время очевидно, что ответ на основной вопрос – каким образом растущей полипептидной цепи удастся преодолеть столь длинный (в масштабе размеров белковой молекулы) путь – остается без ответа. Действительно, «стоп-пептиды», которым в этой обзорной статье было уделено много внимания, представляют собой исключение из правила. Подавляющее большинство синтезируемых рибосомой полипептидных цепей белков должны преодолевать рибосомный туннель беспрепятственно. Что же является движущей силой их перемещения по РТ? Это несомненно одна из основных проблем динамики функционирования рибосомы, без решения которой в наших представлениях о механизме биосинтеза белка будет оставаться серьезный пробел.

Авторы выражают благодарность А.С.Манькину и А.В.Головину за предоставленные данные до их публикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malkin, L.I., Rich, A. (1967) J. Mol. Biol., **26**, 329–346.
2. Blobel, G., Sabatini, D.D. (1970) J. Cell. Biol., **45**, 130–145.
3. Bernabeu, C., Lake, J.A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 3111–3115.
4. Bernabeu, C., Tobin, E., Fowier, A., Zabin, I., Lake, J.A. (1983) J. Cell. Biol., **96**, 1471–1474.
5. Milligan, R.A., Unwin, P.N.T. (1986) Nature, **319**, 693–695.
6. Yonath, A., Leonard, K.R., Wittmann, H.G. (1987) Science, **236**, 813–816.
7. Ryabova, L.A., Selivanova, O.M., Baranov, V.I., Vasiliev, V.D., Spirin, A.S. (1988) FEBS Letters, **226**, 255–260.
8. Wang, S., Sakai, H., Wiedmann, M. (1995) J. Cell. Biol., **130**, 519–528.
9. Frank, J., Zhu, J., Penczek, P., Li, Y., Srivastava, S., Verschoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R., Lata, R.K., Agrawal, R.K. (1995) Nature, **376**, 441–444.
10. Choi, K.M., Brimacombe, R. (1998) Nucl. Acid Res., **15**, 887–895.
11. Mueller, F., Sommer, I., Baranov, P., Matadeen, R., Stoldt, M., Woehnert,

- J., Goerlach, M., van Heel, M. & Brimacombe, R. (2000) J. Mol. Biol., 298, 35–59.*
12. *Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) Science, 289, 905–920.*
13. *Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) Science, 289, 920–930.*
14. *Harms, J., Schlutzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., Yonath, A. (2001) Cell, 107, 679–688.*
15. *Brimacombe, R. (2000) Structure, 8, R195–R200.*
16. *Sergieev, P., Leonov, A., Dokudovskaya, S., Shpanchenko, O., Dontsova, O., Bogdanov, A., Rinke-Appel, J., Mueller, F., Osswald, M., von Knoblauch, K., Brimacombe, R. (2001) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 66, 87–100.*
17. *Сергиев П.В., Донцова О.А., Богданов А.А. (2001) Мол. Биол., 35, 559–583.*
18. *Schmeing, T.M., Ramakrishnan, V. (2009) Nature, 461, 1234–1242.*
19. *Hardesy, B., Kramer, G. (2001) Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 66, 41–66.*
20. *Ramu, H., Mankin, A., Vazquez-Laslop, N. (2008) Molec. Microbiol., 71, 811–824.*
21. *Reusch, R.N., Sadoff, H.L. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4176–4180.*
22. *Pou P.H. (2000) Биохимия, 65, 335–352.*
23. *Rospert, S. (2004) Current Biol., 14, R386–R388.*
24. *Mears, J.A., Cannone, J.J., Stegg, S.M., Guttell, R.R., Agrawal, R.K., Harvey, S.C. (2002) J. Mol. Biol., 321, 215–234.*
25. *Sharma, M.R., Booth, T.M., Simpson, L., Maslov, D.A., Agrawal, R.K., (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 106, 9637–9642.*
26. *Ковальская О.М., Сергиев П.В., Богданов А.А., Донцова О.А. (2007) Успехи биологической химии, 47, 129–188.*
27. *Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., Bukau, B. (2009) Nat. Struct. Mol. Biol., 16, 589–597.*
28. *Giglione, C., Filulaine, S., Meinnel, T. (2009) Trends Biochem. Sci., 34, 417–426.*
29. *Lu, J., Kobertz, W.R., Deutsch, C. (2007) J. Mol. Biol., 371, 1378–1391.*
30. *Lu, J., Deutsch, C. (2005) Nat. Struct. Biol., 12, 1123–1129.*
31. *Lu, J., Deutsch, C. (2008) J. Mol. Biol., 384, 73–86.*
32. *Voss, N.R., Gerstein, M., Steitz, T.M., Moore, P.B. (2006) J. Mol. Biol., 360, 893–906.*
33. *Steitz, T.A. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 9, 242–253.*
34. *Spirin, A.S. (2009) J. Biol. Chem., 284, 21103–21119.*
35. *Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., Frank, J. (2003) Cell, 114, 123–134.*
36. *Schmeing, T.M., Voorhees, R.M., Kelly, A.C., Gao, Y.G., Murphy, F.V. 4th, Weir, J.R., Ramakrishnan, V. (2009) Science, 326, 688–694.*
37. *Gao, Y.G., Selmer, M., Dunham, C.M., Weixbaumer, A., Kelly, A.C., Ramakrishnan V. (2009) Science, 326, 694–699.*
38. *Gabashvili, I.S., Gregory, S.T., Valle, M., Grassucci, R., Worbs, M., Wahl, M.C., Dahlberg A.T., Frank, J. (2001) Mol. Cell, 8, 181–188.*

39. Gilbert, R.J., Fucini, P., Connel, S., Fuller, S.D., Nierhaus, K.H., Robinson, C.V., Dobson, C.M., Stuart, D.I. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 57–66.
40. Fulle, S., Gohlke, H. (2009) *J. Mol. Biol.*, **387**, 502–517.
41. Sergiev, P.V., Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 5439–5442.
42. Купарисов С.В., Сергиев П.В., Богданов А.А., Донцова О.А. (2006) *Мол. Биол.*, **40**, 755–768.
43. Halic, M., Becker, T., Pool, M.R., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Frank, J., Beckmann, R. (2004) *Nature*, **427**, 808–814.
44. Halic, M., Becker, T., Mielke, T., Pool, M.R., Wild, K., Sinning, I., Beckmann, R. (2006) *Nature*, **444**, 507–511.
45. Schaffitzel, C., Ban, N. (2007) *J. Struct. Biol.*, **158**, 463–471.
46. Seidelt, B., Innis, C.F., Wilson, D.N., Gartmann, M., Armache, J.-P., Villa, E., Trabuco, L.G., Becker, T., Mielke, T., Schulten, K., Steitz, T.A., Beckmann, R. (2009) *Science*, **326**, 1412–1415.
47. Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armache, J.-P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., Westhof, E., Gilmore, R., Mandon, E.C., Beckmann, R. (2009) *Science*, **326**, 1369–1373.
48. Woolhead, C.A., McCormick, P.J., Johnson, A.E. (2004) *Cell*, **116**, 725–736.
49. Kosolapov, A., Deutsch, C. (2009) *Nat. Struct. Biol.*, **16**, 405–411.
50. Tu, L., Deutsch, C. (2010) *J. Mol. Biol.*, **396**, 1346–1350.
51. Lim, V.I., Spirin, A.S. (1986) *J. Mol. Biol.*, **188**, 565–577.
52. Bhushan, S., Gartmann, M., Halic, M., Armache, J.-P., Jarasch, A., Mielke, T., Berninghausen, O., Wilson, D.N., Beckmann, R. (2010) *Nat. Struct. Biol.*, **17**, 313–317.
53. Marqusee, S., Baldwin, R.L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8898–8902.
54. Sicheri, F., Yang, D.S. (1995) *Nature*, **375**, 427–431.
55. Barron, L.D., Hecht, L., Wilson, G. (1997) *Biochemistry*, **36**, 13143–13147.
56. Манькин А. (2001) *Мол. биол.*, **35**, 597–609.
57. Wilson, D.N., Harms, J.M., Nierhaus, K.H., Schlunzen, F., Fucini, P. (2005) **386**, 1239–1252.
58. Wimberly, B.T. (2009) *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **10**, 750–765.
59. Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F. (2001) *Nature*, **413**, 814–821.
60. Hansen, J., Ippolito, J.A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 117–128.
61. Omura, S. (2002) *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice*, 2nd Edition, Academic Press. 635 p.
62. Hansen, L.H., Mauvais, P., Douthwaite, S. (1999) *Mol. Microbiol.*, **31**, 623–631.
63. Moazed, D., Noller, H.F. (1987) *Biochimie*, **69**, 879–884.
64. Poulsen, S.M., Kofoed, C., Vester, B. (2000) *J. Mol. Biol.*, **304**, 471–481.
65. Liu, M., Douthwaite, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14658–14663.
66. Lai, C.J., Weisblum, B. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 856–860.
67. Skinner, R., Cundliffe, E., Schmidt, F.J. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 12702–12706.

68. Douthwaite, S. (1992) *J. Bacteriol.*, **174**, 1333–1338.
69. Sigmund, C.D., Morgan, E.A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5602–5606.
70. Weisblum, B. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 577–585.
71. Vester, B., Douthwaite, S. (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1–12.
72. Gregory, S.T., Dahlberg, A.E. (1999) *J. Mol. Biol.*, **289**, 827–834.
73. Garza-Ramos, G., Xiong, L., Zhong, P., Mankin, A. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 6898–6907.
74. Petropoulos, A.D., Kouvella, E.C., Dinos, G.P., Kalpaxis, D.L. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 4756–4765.
75. Rodriguez-Fonseca, C., Amils, R., Garrett, R.A. (1995) *J. Mol. Biol.*, **247**, 224–235.
76. Auerbach, T., Bashan, A., Yonath, A. (2004) *Trends Biotechnol.*, **22**, 570–576.
77. Steitz, T.A. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 955–958.
78. Tu, D., Blaha, G., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2005) *Cell*, **121**, 257–270.
79. Vazquez-Laslop, N., Thum, C., Mankin, A.S. (2008) *Mol. Cell*, **30**, 190–202.
80. Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M. (2003) *J. Mol. Biol.*, **330**, 1005–1014.
81. Matsuoka, M., Inoue, M., Endo, Y., Nakajima, Y. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.*, **220**, 287–293.
82. Furneri, P.M., Rapazzo, G., Musumarra, M., Pietro, P., Catania, L.S., Roccasalva, L.S. (2001) *Antibiot. Chemother.*, **45**, 2958–2960.
83. Sutcliffe, J.A. (2004) *Features*, **70**, 513–519.
84. Douthwaite, S., Crain, P.F., Liu, M., Poehlsgaard, J. (2004) *J. Mol. Biol.*, **337**, 1073–1077.
85. Pfister, P., Corti, N., Hobbie, S., Bruell, C., Zarivach, R., Yonath, A., Bottger, E.C. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5180–5185.
86. Mankin, A.S. (2008) *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 414–421.
87. Schroeder, S.J., Blaha, G., Moore, P.B. (2007) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 4462–4465.
88. Сумбатян Н.В., Коришнуова Г.А., Богданов А.А. (2003) *Биохимия*, **68**, 1463–1468.
89. Коришнуова Г.А., Сумбатян Н.В., Федорова Н.В., Кузнецова И.В., Шишкина А.В., Богданов А.А. (2007) *Биоорг. химия*, **33**, 235–244.
90. Сумбатян Н.В., Кузнецова И.В., Карпенко В.В., Федорова Н.В., Чертков В.А., Коришнуова Г.А., Богданов А.А. (2010) *Биоорг. химия*, **36**, 265–276.
91. Starosta, A.L., Karpenko, V.V., Shishkina, A.V., Mikolajka, A., Sumbatyan, N.V., Schlutzen, F., Korshunova, G.A., Bogdanov, A.A., Wilson, D.N. (2010) *Chem. Biol.*, **17**, 504–514.
92. Lovett, P.S., Rogers, E.J. (1996) *Microbiol. Rev.*, **60**, 366–385.
93. Morris, D.R., Geballe, A.P. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8635–8642.
94. Tenson, T., Ehrenberg, M. (2002) *Cell*, **108**, 591–594.
95. Nakatogawa, H., Ito, K. (2002) *Cell*, **108**, 629–636.
96. Gong, F., Yanofsky, C. (2002) *Science*, **297**, 1864–1867.
97. Vazquez-Laslop, N., Thum, C., Mankin, A.S. (2008) *Mol. Cell*, **30**, 190–202.

98. Wang, Z., Fang, P., Sachs, M. (1997) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 7528–7536.
99. Raney, A., Law, G.L., Mize, G.J., Morris, D.R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 5988–5994.
100. Lovett, P.S. (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 6415–6417.
101. Gu, Z., Harrod, R., Rogers, E.J., Lovett, P.S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5612–5616.
102. Rogers, E.J., Lovett, P.S. (1994) *Mol. Microbiol.*, **12**, 181–186.
103. Weisblum, B. (1995) *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **39**, 797–805.
104. Ramu, H., Mankin, A., Vasquez-Laslop, N. (2008) *Molec. Microbiol.*, **71**, 811–824.
105. Bayfield, M.A., Thompson, J., Dahlberg, A.E. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5512–5518.]
106. Nakatogawa, H., Ito, K. (2004) *ChemBioChem*, **5**, 48–51.
107. Muto, H., Nakatogawa, H., Ito, K. (2006) *Mol. Cell*, **22**, 545–552.
108. Pavlov, M.Y., Watts, R.E., Tan, Z., Cornish, V.W., Ehrenberg, M., and Forster, A.C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 50–54.
109. Muto, H., Ito, K. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **366**, 1043–1047.
110. Wohlgemuth, I., Brenner, S., Beringer, M., Rodnina, M.V. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 32229–32235.
111. Suhonara, T., Abo, T., Inada, T., Aiba, H. (2002) *RNA*, **8**, 1416–1427.
112. Roche, E.D., Sauer, R.T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 28509–28515.
113. Tanner, D.R., Carillo, D.A., Woolstenhulme, C.J., Broadbent, M.A., Buskirk, A.R. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 34809–34818.
114. Шпанченко О.В., Иванов П.В., Зверева М.Э., Богданов А.А., Донцова О.А. (2004) *Молекуляр. биология*, **38**, 914–925.
115. Woolhead, C.A., Johnson, A.E., Bernstein, H.D. (2006) *Mol. Cell*, **22**, 587–598.
116. Yap, M.-N., Bernstein, H.D. (2009) *Mol. Cell*, **34**, 201–211.
117. Schmeing, T.M., Seila, A.C., Hansen, J.L., Freeborn, B., Soukup, J.K., Scaringe, S.A., Strobel, S.A., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 225–230.
118. Hansen, J.L., Schmeing, T.M., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11670–11675.
119. Богданов А.А. (2003) *Мол. биол.*, **37**, 436–439.
120. Wang, D., Ding, X., Rather, P.N. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 4210–4216.
121. Ren, D., Bedzyk, L.A., Ye, R.W., Thomas, S.M., Wood, T.K. (2004) *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2038–2043.
122. Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T., Yamaguchi, A. (2005) *Mol. Microbiol.*, **55**, 1113–1126.
123. Kazarinoff, M.N., Snell, E.E. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 7598–7602.
124. Gollnick, P., Yanofsky, C.J. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 3100–3107.
125. Gong, F., Yanofsky, C. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 1974–1983.
126. Yanofsky, C. (2007) *RNA*, **13**, 1141–1154.
127. Gong, F., Ito, K., Nakamura, Y., Yanofsky, C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8997–9001.
128. Gong, M., Cruz-Vera, L.R., Yanofsky, C. (2007) *J. Bacteriol.*, **189**, 3147–3155.

-
129. Cruz-Vera, L.R., Rajagopal, S., Squires, C., Yanofsky, C. (2005) *Mol. Cell*, **19**, 333–343.
130. Cruz-Vera, L.R., New, A., Squires, C., Yanofsky, C. (2007) *J. Bacteriol.*, **189**, 3140–3146.
131. Mankin, A.S. (2006) *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 11–13.
132. Torrice, M.M., Bower, K.S., Lester, H.A., Dougherty, D.A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 11919–11924.
133. Trabuco, L.G., Harrison, C.B., Schreiner, E., Schulten, K. (2010) *Structure*, **18**, 627–637.