

СВОЙСТВА ВНУТРИРИБОСОМНОГО УЧАСТКА РАСТУЩЕГО ПОЛИПЕПТИДА

©2010 г.

В. А. КОЛБ

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Криоэлектронная микроскопия транслирующих рибосом. III. Локализация домена выхода растущего полипептида на рибосоме. IV. Визуализация рибосомного туннеля с помощью рентгеноструктурного анализа. V. Величина скрытого в рибосоме участка растущего полипептида. VI. Конформация рибосомного участка растущего полипептида. VII. Доступность внутририбосомного участка синтезируемой полипептидной цепи. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Синтезируемая на рибосоме полипептидная цепь, начинаясь в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ), по мере элонгации следует к выходу на поверхность большой субчастицы по скрытому внутри рибосомы «маршруту», называемому каналом для растущего полипептида (рис. 1). Внимание исследователей к этому элементу рибосомной структуры обусловлено несколькими причинами. Во-первых, канал служит ближайшим окружением синтезируемой полипептидной цепи, и, таким образом, может накладывать определённые ограничения и вносить определённый вклад в котрансляционное формирование пространственной структуры белка. Кроме того, контактируя с растущей цепью, канал может служить сенсором, генерирующим конформационные «сигналы» для передачи в функциональные центры рибосомы. В настоящее время считается, что каналом

Принятые сокращения: ПТЦ – пептидилтрансферазный центр рибосомы, а.о. – аминокислотный остаток, PCA – рентгеноструктурный анализ, SRP – сигнал-узнающая частица, PDF – пептиддеформилаза, TF – триггер фактор, NAC – комплекс, ассоциированный с растущим полипептидом (Nascent Polypeptide Associated Complex), TDB – 4-(3-трифторметилдiazирино) бензоат [4-(3-trifluoromethyl diazirino) benzoate].

Адрес для корреспонденции: kolb@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 09-04-01447-а), программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и программы поддержки научных исследований, проводимых ведущими научными школами Российской Федерации (грант НШ-8488.2010.4).

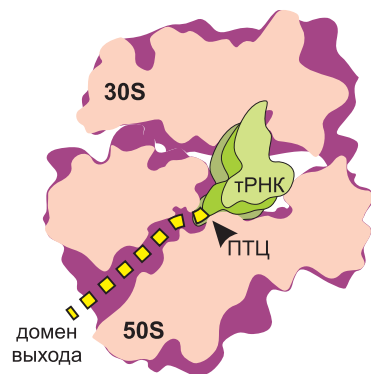


Рис.1 Расположение синтезируемого полипептида в транслирующей рибосоме в соответствии с концепцией «туннеля для выхода» растущей полипептидной цепи. На схеме удалена половина рибосомы с L7/L12-протуберанцем. Плоскость сечения проходит сквозь обе субчастицы, ПТЦ (указан стрелкой) и продольную ось туннеля большой субчастицы. Растущий полипептид обозначен желтой пунктирной линией. Силуэт тРНК, находящейся в А-участке, расположен на переднем плане.

для растущего полипептида служит внутририбосомный туннель большой субъединицы рибосомы (см. обзор [1]).

Представление о канале для растущего полипептида в виде туннеля в большой рибосомной субчастице впервые сформулировано в работах Лэйка [2, 3]. Первоначально оно основывалось на двух группах данных: результатах иммуоэлектронной микроскопии по локализации места выхода пептида на поверхность рибосомы и результатах определения длины участка растущего пептида, защищаемого рибосомой от воздействия протеаз.

Первая попытка определения экранированности синтезируемого рибосомой пептида от протеолитического воздействия была предпринята Малкиным и Ричем [4]. Авторы названной работы обрабатывали полисомы, выделенные из ретикулоцитов кролика, различными протеазами: проназой, папаином, смесью трипсина с химотрипсином. Обработку вели при 0°, сохранность рибосом контролировали по их седиментационным характеристикам. Длину участка радиоактивно меченного пептида, защищаемого рибосомой в данных условиях, оценивали с помощью гель-хроматографии. Длина скрытого от протеаз участка составила 30–35 аминокислотных остатков (а.о.). Разворачивание рибосом понижением концентрации ионов магния в среде приводило к полной деградации растущего пептида протеазами.

Эксперименты с «пульсовой» радиоактивной меткой растущего пептида и последующим протеолизом показали также, что устойчивостью к протеазной атаке обладала именно проксимальная, связанная с рибосомой, С-концевая часть пептида [4].

Авторы этой работы предположили два возможных варианта экранировки синтезируемой полипептидной цепи от воздействия

протеаз: либо растущая цепь проходит внутри рибосомы, либо по ее поверхности, но в некоем желобке. Оба случая предусматривают защиту определенного участка полипептидной цепи от протеолиза.

Похожие результаты были опубликованы в 1970 г. Блобелем и Сабатини [5]. Полипептидные цепи, синтезированные на рибосомах из печени крысы, подвергали ограниченному протеолизу трипсином и химотрипсином. Длина защищенного участка растущей цепи составляла примерно 39 а.о. (по результатам гель-хроматографии). Целостность рибосом контролировали седиментационным анализом и электрофорезом рибосомных белков. Следует отметить, что протеолиз вызывал почти полную диссоциацию монорибосом, а также значительные изменения подвижности рибосомных белков.

Экранированность растущего пептида прокариотическими рибосомами изучали в группе Дэвиса [6]. Рибосомы *Bacillus subtilis*, несущие меченные *in vivo* [³⁵S]метионином пептиды, обрабатывали проназой. Анализ меченых продуктов протеолиза проводили двумя способами: гель-хроматографией и дансированием N-концевого метионинового остатка. Последний метод основан на случайном распределении метиониновых остатков в пептидах, синтезируемых *in vivo*, и на способности к дансированию метионина со свободной NH₂-группой, т. е. находящегося на N конце протеолитического фрагмента. Согласно теории вероятностей, отношение общего количества метионина к количеству N-концевого (определяемому по количеству дансилметионина) и составляет длину полипептида в а.о. Оба приема дали сходные результаты – 30 а.о. по гель-хроматографии и 28 по дансированию [6].

Таким образом, на основании результатов цитированных работ [4–6] был сделан вывод, что при определенных условиях эукариотическая рибосома защищает от протеазной атаки 30–39, а прокариотическая – около 30 а.о. С-концевой части синтезируемого пептида. Однако оставалось неясным, где проходит синтезируемая полипептидная цепь – внутри рибосомы или по ее поверхности; также оставался открытым вопрос о конформационном состоянии растущей цепи. Чтобы ответить на эти вопросы была осуществлена прямая электронномикроскопическая локализация места выхода синтезируемого белка на поверхность рибосомы [2, 3]. Использование антител к β-галактозидазе, синтезируемой рибосомами *Escherichia coli*, выявило место выхода белка в районе большой субчастицы, удаленном от центрального протуберанца и противостоящем поверхности межсубчастичного контакта [2] (см. рис. 2). Этот район был назван «доменом выхода». Выход белка рибулезо-1,5-дифосфаткарбоксылазы

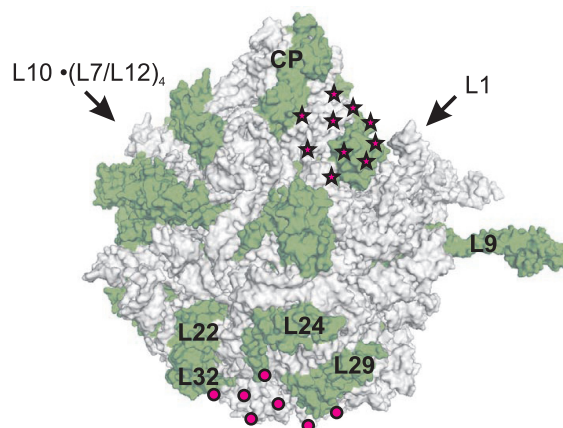


Рис. 2 Домен выхода синтезируемого полипептида на поверхность рибосомы по данным электронной микроскопии. Внешняя, выпуклая поверхность 50S субчастицы *E. coli* показана в соответствии с данными PCA (PDB ID 1VS6). Поверхность РНК серая, белков – зеленая (для некоторых белков приведены обозначения). Стрелки указывают на расположение соответствующих протуберанцев субчастицы, CP – центральный протуберанец. Локализация домена по Лэйку [3] обозначена кружками, альтернативная локализация [28] – звездами.

на 80S рибосомах растения *Lemna gibba* совпадает, по данным Лэйка [3], с «доменом выхода» прокариотических рибосом.

В то же время очевидно, что путь растущей полипептидной цепи должен начинаться в ПТЦ, там, где происходит присоединение очередной аминокислоты к С концу пептида. По имеющимся в то время данным, ПТЦ располагали на контактирующей (вогнутой) поверхности большой субчастицы, рядом с центральным протуберанцем (головкой), в районе желобка, отделяющего головку от тела субчастицы [7–9].

Это означало, что N конец растущего пептида для того, чтобы оказаться в «домене выхода», должен преодолеть расстояние от ПТЦ до «домена выхода», которое, по оценкам Лэйка, составляет по прямой примерно 140 Å для прокариотических рибосом [2, 3] и 160 Å – для эукариотических [3]. Если предположить, что растущий пептид находится в конформации полностью вытянутой цепи, когда на один а.о. приходится около 3,6 Å, то до выхода на рибосомную поверхность дотянутся пептиды из 33–45 а.о. и из 37–51 остатка у про- и у эукариот, соответственно, что совпадает с оценкой длины защищаемого рибосомой от протеолиза участка цепи [4–6]. Это привело к выводу о существовании внутри большой субчастицы туннеля,

ведущего от ПТЦ к «домену выхода». Находящийся в этом туннеле синтезируемый пептид недоступен протеазам.

Таким образом, концепция рибосомного канала для синтезируемого полипептида была сформулирована из следующих взаимозависимых положений:

- а) синтезируемый рибосомой полипептид выходит на рибосомную поверхность в «домене выхода» большой субчастицы;
- б) растущий пептид проходит из ПТЦ к «домену выхода» из рибосомы по туннелю сквозь большую субчастицу;
- в) пептид в туннеле находится в конформации развернутой и полностью вытянутой цепи.

Настоящий обзор посвящён анализу этой концепции в свете имеющихся экспериментальных данных о доступности растущей полипептидной цепи молекулам модифицирующих агентов и тушителей флуоресценции, результатов определения места выхода растущего пептида на поверхность рибосомы, возможных конформационных состояний растущего полипептида и данных о его сворачивании на рибосоме. Особое внимание уделено данным, не укладывающимся в концепцию «туннеля для выхода пептида», и результатам, полученным до надёжной визуализации туннеля с помощью рентгеновской кристаллографии. Рассмотрение основано на характеристиках рибосомного туннеля, выявляемых РСА кристаллов 70S рибосом и 50S субчастиц.

II. КРИОЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ТРАНСЛИРУЮЩИХ РИБОСОМ

Первые попытки визуализации рибосомного туннеля были предприняты с помощью техники трехмерной реконструкции электронно-микроскопических изображений плоских двумерных кристаллов 70S рибосом и 50S субчастиц, выделенных и очищенных из термофильного микроорганизма *Bacillus stearothermophilus* [10, 11]. На полученных изображениях видны области с пониженной электронной плотностью в большой рибосомной субъединице. По мнению авторов эти области внутри 50S субчастиц соответствуют пустотам или полостям протяженностью в 100 Å и диаметром в 25 Å. Нечто похожее на рибосомный туннель было обнаружено с помощью трехмерной реконструкции электронно-микроскопических изображений и у эукариотических рибосом [12]. К сожалению, разрешение использованной в этих работах техники находилось в пределах 30–47 Å, что явно недостаточно для достоверной визуализации

туннеля диаметром 25 Å. Тот факт, что этот структурный элемент не всегда хорошо виден на трехмерной реконструкции электронно-микроскопических изображений [10–14], авторы объясняли возможностью заполнения его растущим пептидом [15].

С развитием техники электронной микроскопии и совершенствованием математического аппарата распознавания и анализа образов стало возможным получение качественных криоэлектронно-микроскопических изображений рибосом и их комплексов. В работах групп ван Хила [16, 17] и Франка [18, 19] был визуализирован не просто туннель, но сеть туннелей, пронизывающих большую субъединицу бактериальной рибосомы, а также целый набор полостей, пустот и брешей в рибосоме [20]. Авторы работы [18], основываясь на наблюдаемом ветвлении туннеля, предположили также возможную множественность доменов выхода растущего полипептида на поверхность рибосомы. Разрешение, достигнутое в этих работах, составляло от 20–23 Å [16, 17] до 25 Å [18, 19], что, к сожалению, не позволяло достоверно определить морфологические характеристики туннеля. Метод был применён и к эукариотическим рибосомам – растительным [21] и дрожжевым [22], обнаружив при разрешении в 35–38 Å их значительное морфологическое сходство с бактериальными и присутствие туннеля переменного диаметра, пронизывающего 60S субъединицу и заканчивающегося узким отверстием [22]. Сравнение более детальных (с разрешением в 24 Å) результатов трёхмерной реконструкции криоэлектронно-микроскопических изображений рибосом дрожжей и кролика привело к аналогичным выводам [23]. Авторы приписывают внутририбосомному туннелю длину около 100 Å и усреднённый диаметр приблизительно в 20 Å. Сходные данные были получены и для туннеля в рибосомах из печени крысы [24].

В появившихся недавно работах группы Бекмана по криоэлектронной микроскопии гомогенного препарата рибосом, несущих полипептидные цепи заданной длины, заявлено, что растущий полипептид визуализирован в туннеле большой субчастицы [25–27]. Действительно, авторам процитированных работ удалось достичь рекордного для этого метода разрешения в 5.8 Å [25], и при этом обнаружить островки электронной плотности внутри туннеля. Обнаруженные в туннеле электронно-плотные образования были отнесены к участкам растущей цепи. Разумеется, даже столь высокого разрешения недостаточно для идентификации отдельных аминокислотных остатков растущего полипептида, что снижает уверенность в предложенном авторами отнесении. Тот факт, что растущая цепь при таком отнесении не является непрерывной, объясняется различной подвижностью

разных её участков. Кроме того, авторы приписывают синтезируемому полипептиду набор определённых взаимодействий со стенками туннеля, изменяющийся при каждом акте элонгации. Наличие многоцентрового связывания полипептидной цепи со стенками туннеля должно было бы существенно затруднить продвижение синтезируемого полипептида по рибосоме, и, несомненно, замедлило бы освобождение растущей цепи из рибосомы после терминации или пурамициновой реакции. Описания такого замедления, однако, в научной литературе найти не удалось. Кроме того, многоцентровое связывание должно было бы значительно уменьшить подвижность растущего полипептида внутри туннеля и, тем самым, сообщить ему электронную плотность, близкую к плотности малоподвижных участков рибосомной структуры. Наблюдаемая авторами работы [25] электронная плотность объекта, отнесённого ими к растущей полипептидной цепи, значительно ниже. Таким образом, вряд ли можно назвать окончательной криоэлектронно-микроскопическую локализацию растущей полипептидной цепи в рибосомном туннеле: она может быть пересмотрена, как и многие другие данные, полученные этим методом.

III. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДОМЕНА ВЫХОДА РАСТУЩЕГО ПОЛИПЕПТИДА НА РИБОСОМЕ

Локализация «домена выхода» растущего полипептида из туннеля, выполненная в группе Лэйка с помощью иммуноэлектронной микроскопии, может быть не вполне точной вследствие большой величины синтезированного белка. Фактически было определено не место выхода пептида из рибосомы, а место поверхностной локализации антигенных детерминант крупного завершённого белка [2, 3], что не одно и то же. Поэтому эксперименты по уточнению локализации «домена выхода» были предприняты с рибосомами, заряженными короткими пептидами, несущими на N конце динитрофенильный гаптен, который и взаимодействовал с антителами [28]. Для получения коротких пептидов на рибосомах *E. coli* использовали бесклеточную систему трансляции с неполным набором аминокислот. В систему давали только те аминокислоты, которые входят в состав N-концевого участка белка оболочки фага MS2 длиной в 42 остатка. В результате было выявлено два места локализации N конца растущих пептидов: первое совпадало с «доменом выхода» по Лэйку, второе находилось между основанием центрального протуберанца и L1-гребнем. Авторы [28] предположили, что N конец растущего пептида, выходя из ПТЦ,

следует далее по желобку на поверхности 50S субчастицы и заканчивается в «доме выхода» по Лэйку.

Другим способом обнаружения домена выхода служит локализация на рибосоме молекул, взаимодействующих с относительно короткими растущими полипептидами. В качестве таких молекул могут служить триггер фактор (TF), сигнал-узнающая частица (SRP), пептиддеформилаза (PDF), а также транслоцирующий мембранный комплекс (транслокон). Для белков, котрансляционно транслоцирующихся в эндоплазматический ретикулум, выход из рибосомы сопряжён с обязательной ассоциацией растущей цепи с транслоконном. Аналог такого ассоциата, состоящий из вакантных рибосом дрожжей и гетеротримерного комплекса Sec61 (без растущего полипептида, мембраны и других компонентов транслокона), был получен и исследован с помощью криоэлектронной микроскопии [29]. Оказалось, что внутририбосомный туннель не только ясно виден на трёхмерной реконструкции электронномикроскопических изображений, но и в точности соосен (коаксиален) тримерному комплексу Sec61. Иными словами, рибосомный туннель открывался непосредственно во внутреннее, межсубъединичное отверстие тримера Sec61, что поддерживало заключение авторов об идентичности внутририбосомного туннеля с каналом для растущей полипептидной цепи [29]. Однако после того, как структура транслокона была установлена с помощью РСА, стало ясно, что пептид-проводящим каналом транслокона может служить единственная субъединица – Sec61 α или SecY [30] – а не тример. Это означает, что туннель должен открываться скорее во внутреннюю полость этой субъединицы, а не в межсубъединичное пространство транслокона. Интересно, что криоэлектронная микроскопия транслирующих рибосом, вслед за ранней электронномикроскопической работой по локализации N конца растущих пептидов на рибосоме [28], выявила два участка связывания транслокона. Вместе с «домом выхода» по Лэйку способностью связывать транслокон обладал и участок вблизи L1-протуберанца [31]. Авторы названной работы из группы Франка утверждают, что наблюдаемое ими взаимодействие транслокона с районом белка L1 происходит по причине сродства транслокона к мРНК, а не к растущему пептиду, и, таким образом, обнаруженный комплекс не имеет отношения к выходу пептида на поверхность рибосомы. Сродство транслокона к мРНК, однако, никем ранее показано не было. Для полного соответствия данных, полученных в работах [28] и [31], остаётся предположить, что антитела к динитрофенильному гаптену также обладали сродством к 5'-проксимальному участку мРНК, поки-

нувшему декодирующий участок рибосомы и появившемуся на её поверхности рядом с L1-протуберанцем.

В то же время локализация участков связывания белков и комплексов, взаимодействующих с растущими полипептидами – SRP [32], доставляющей транслирующие рибосомы к мембранам для котрансляционной трансмембранной транслокации синтезируемых полипептидов, PDF [33], удаляющей формильную группу N-концевого формилметионина, и TF [34–35], обладающего шаперонной активностью, – приводит к одному и тому же участку вблизи выхода из туннеля. Там же, как предполагают авторы работы [36], расположен и участок связывания метиониновой аминопептидазы (MetAP), удаляющей N-концевой метионин из многих растущих полипептидов. Очевидно, однако, что одновременное связывание всех этих макромолекул на сравнительно небольшом участке рибосомной поверхности невозможно. Кроме того, их взаимодействие с N концом растущей цепи должно осуществляться поочередно (так, MetAP взаимодействует с полипептидом только после удаления формильной группы с помощью PDF [37–38]), что лишает смысла существование перекрывающихся или идентичных участков связывания. Следует также заметить, что в действительности с помощью РСА были определены участки связывания небольших фрагментов PDF и TF, а не полноразмерных белков. Для этого выращенные кристаллы рибосом вымачивали в растворах фрагментов соответствующих белков. Понятно, что кристаллическая упаковка рибосом и межрибосомные контакты в ней не допускают взаимодействия макромолекул с любыми участками рибосомной поверхности, а только со стерически доступными. Следовательно, использованный экспериментальный подход мог ограничить круг поиска и исключить обнаружение истинных участков связывания.

Приводимые возражения по точности локализации домена выхода становятся более значимыми в свете результатов работы, проделанной с интактными фрагментами шероховатого эндоплазматического ретикулума с помощью электронной микроскопии платиновых реплик этих фрагментов [39]. Авторы обнаружили, что просвет интактного транслокона, находящегося в комплексе с заряженной пептидом рибосомой, коаксиален не внутририбосомному туннелю, а межсубъединичному пространству рибосомы. Обе субъединицы рибосомы, согласно полученным данным, контактируют с белками транслоцирующего мембранного комплекса, и выход пептида из рибосомы локализован непосредственно у межсубъединичной расщелины [39]. Такое расхождение с результатами группы Франка [31] может быть объяснено как различиями в методике исследований, так и в степени интактности объекта исследования.

Так или иначе, надёжных данных, свидетельствующих о прохождении растущего полипептида по внутририбосомному туннелю, нам найти не удалось, хотя ряд результатов указывает на именно такую локализацию растущей полипептидной цепи.

IV. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНУТРИРИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

Первое же успешное решение структуры 50S рибосомной субъединицы из археи *Haloarcula marismortui* с разрешением в 9 Å выявило внутририбосомный туннель, идущий от ПТЦ к «домену выхода» из рибосомы [40]. Улучшение разрешения до 5 Å [41] позволило охарактеризовать морфологию туннеля: его длина составляет чуть более 100 Å, а срединная линия туннеля является практически прямой. Стенки туннеля не гладкие, они имеют развитую поверхность сложной морфологии, а диаметр составляет около 20 Å. Кристаллы субъединицы для РСА и фазирования по тяжелоатомным замещениям были выдержаны в растворе гетерополивольфрамата, каждая молекула которого содержала 11 атомов вольфрама. Оказалось, что четыре тяжелоатомных кластера расположились во внутририбосомном туннеле на всём его протяжении [41] (см. рис.3).

Дальнейшее улучшение разрешения до 2.4 Å и получение высокоупорядоченных кристаллов субъединиц позволили выяснить, что стенки туннеля состоят в основном из рРНК, а также определить, какие рибосомные белки находятся вблизи туннеля или являются частью его стенок [42]. Было выяснено, что сужение туннеля и его небольшой изгиб вблизи ПТЦ сформированы белками L4 и L22, которые своими неглобулярными участками выходят прямо в туннель с противоположных сторон [42, 43]. Изгиб находится на расстоянии 20–35 Å от ПТЦ. Диаметр туннеля (среднее значение 15 Å) варьирует от 20 Å в самом просторном его месте до 10 Å в двух сужениях: одно рядом с ПТЦ, другое – на расстоянии 28 Å от выхода из туннеля. Большую часть белковой компоненты поверхности туннеля составляет участок белка L22; значителен также вклад белка L39e, не имеющего глобулярной части и, по-видимому, неструктурированного в свободном виде [42, 43]. Все пять доменов 23S рРНК участвуют в формировании поверхности туннеля: 28 участков, образующих стенки туннеля, расположены по всей длине молекулы РНК и относятся, как правило, к петлям в её вторичной структуре. Начало туннеля образовано доменом V 23S рРНК, следующие 20 Å протяжённости туннеля формируют совместно участки доменов II и IV, а также белки L22

и L4. Дистальная половина туннеля выстлана участками доменов I и III, белком L39e и участком глобулярной части белка L22 [43]. В целом же поверхность туннеля не содержит протяжённых заряженных или гидрофобных участков, что, по мнению авторов работы [43], делает возможным движение развёрнутой полипептидной цепи внутри туннеля без её связывания и фиксации на стенках. Сужение, образованное белками L22 и L4, предположительно может функционировать как клапан, открывающийся при поступлении сигнала от связывания с транслоконом; или наоборот – сигнал от клапана может подготовить связывание с транслоконом, поскольку глобулярная часть белка L22 находится вблизи домена выхода (вместе с белками L19, L23, L24, L29 и L31e) [43].

Решение структуры полной 70S рибосомы *Thermus thermophilus* с разрешением в 7.8 Å [44] и 5.5 Å [45] также обнаружило присутствие внутририбосомного туннеля 50S субъединицы со сходными характеристиками. Домен выхода на рибосоме из *T. thermophilus* окружают белки L22, L24 и L29. В 50S субъединице эубактериального мезофила *Deinococcus radiodurans*, структура которой была получена с 3.1 Å-разрешением, туннель также обнаружен [46]. Различия в морфологии туннеля и в окружении домена выхода для архейного и эубактериального микроорганизмов сводятся к тому, что белки L23 и L31e из *H. marismortui* слиты в единый полипептид L23 из *D. radiodurans*.

Очевидно, что хорошо документированный факт существования внутририбосомного туннеля не доказывает того, что растущая полипептидная цепь в процессе трансляции проходит по нему к выходу из рибосомы, хотя ряд косвенных данных указывает на именно такой «маршрут» растущего пептида [47]. К сожалению, результаты РСА рибосом или 50S рибосомных субъединиц, содержащих пептидил-тРНК с достаточно протяжённой полипептидной цепью, пока не получены.

V. ВЕЛИЧИНА СКРЫТОГО В РИБОСОМЕ УЧАСТКА РАСТУЩЕГО ПОЛИПЕПТИДА

Предположение о полностью вытянутой конформации растущей цепи в рибосоме и длине туннеля в 100 Å (120 Å для эукариот) приводит к заключению, что во внутририбосомном туннеле должно скрываться как минимум 28 а.о. синтезируемого полипептида (33 остатка для эукариотических рибосом). Эти оценки хорошо согласуются с результатами контролируемого протеолиза [4–6], хотя Малкин и Рич справедливо отметили, что участок пептида в 30–40 а.о. может быть защищен от протеазной атаки в силу возможных стерических

загрудений при подходе протеазы к пептиду, даже находящемуся на поверхности рибосомы, в желобке, а не в туннеле [4]. Это же возражение относится и к результатам работ [48–49], соавтором которых является автор настоящего обзора. Ранее нами было показано, что биосинтез глобулярных белков сопровождается сворачиванием растущей полипептидной цепи (котрансляционное сворачивание), в результате которого из рибосомы освобождается свернутый белок с полностью сформированной пространственной структурой [50–51]. Сворачивание растущего полипептида в биологически активный белок может произойти и без освобождения из рибосомы при условии отсутствия в рамке считывания терминирующего кодона и удлинения С-концевого участка дополнительной (не закодированной в гене дикого типа) аминокислотной последовательностью. Очевидно, что дополнительный С-концевой сегмент отдаляет сворачивающийся белок от ПТЦ рибосомы, позволяя природному С концу цепи занять необходимое положение в структуре свёрнутого белка. Оказалось, что в случае эукариотической рибосомы длина этого дополнительного сегмента должна составлять не менее 26 остатков [48–49]. Принимая во внимание тот факт, что несколько С-концевых остатков (не более 12) могут быть удалены из структуры люциферазы без существенного снижения её активности, полученная величина соответствует оценке величины полностью вытянутого полипептида в туннеле эукариотической рибосомы. Следует отметить, что оценка длины скрытого в рибосоме участка растущей цепи в работах [48–49] была проведена на интактных рибосомах, не повреждённых ни протеолитическим воздействием, ни ковалентными сшивками. Столь же щадящие эксперименты были проведены в лаборатории Родниной, где обнаружено взаимодействие SRP с N-концевым сигнальным пептидом короткой растущей полипептидной цепи, целиком расположенной (как постулируют авторы работы) внутри рибосомного туннеля [52]. Для объяснения наблюдаемого взаимодействия авторы привлекают гипотезу конформационной передачи сигнала из туннеля с сигнальным пептидом внутри к участку связывания частицы на поверхности рибосомы. Возможно, что верным окажется более простое объяснение, состоящее в такой локализации сигнального пептида или SRP на рибосоме, которая обеспечивает доступ частицы даже к коротким растущим цепям.

Открытие NAC – комплекса, ассоциированного с растущими пептидами [53], – вызвало серьёзные сомнения в справедливости предположения о внутририбосомном туннеле как канале для растущего пептида. Было показано, что цитоплазматический фактор, являющийся α -гетеродимером с субъединицами в 33 и 21 кДа и

обильно представленный в цитоплазме, взаимодействует с растущими полипептидными цепями сразу при их появлении из рибосомы [53]. Функция фактора NAC состоит в предотвращении котрансляционной транслокации сквозь мембрану полипептидов, к этому не предназначенных. NAC обратимо ассоциирует со всеми растущими пептидными цепями, причём с каждой цепью взаимодействует несколько молекул фактора. Из такого комплекса NAC легко вытесняется SRP, но только лишь в том случае, если растущая цепь имеет N-концевой сигнальный пептид. Рибосомный комплекс с SRP далее участвует в транслокации, а содержащие NAC рибосомные комплексы с транслоконом не взаимодействуют [53, 54]. Из таких комплексов NAC, по-видимому, диссоциирует при котрансляционном сворачивании растущего полипептида. Определение района связывания NAC с растущим полипептидом привело к неожиданному результату: оказалось, что в отсутствие NAC фактор Ха гидролизует растущий пептид по участку узнавания, находящемуся на расстоянии всего в 12 а.о. от ПТЦ [55]. Принимая во внимание диаметр туннеля и размеры фактора Ха (белка с молекулярной массой в 46 кДа), можно с уверенностью утверждать, что фактор не может попасть внутрь туннеля. Авторы работы вводили участок узнавания протеазы Ха в растущий пептид на разном удалении, а именно на 12, 15, 18, 19, 23, 24, 25, 27, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 47, 58 и более 100 остатков от С конца и наблюдали Ха-специфичный гидролиз в каждом из этих вариантов в отсутствие NAC (рис. 3). В присутствии NAC гидролиз происходил только на участках, удалённых от ПТЦ более чем на 33 а.о. На более близких к С концу участках, при удалении в 12, 15, 18, 19, 23, 24, 25 и 27 а.о., гидролиза не происходило [55]. По всей видимости, ассоциация NAC с участками растущего полипептида, удалёнными от ПТЦ более чем на 33 а.о., происходит менее прочно и не препятствует взаимодействию с фактором Ха.

В этой же работе было обнаружено, что сшивка NAC с несущими фотоактивируемую группу TDB лизинами растущей цепи происходит на удалении в 17, 27, 30, 33, 34, 35, 36, 38, 43, 44, 46, 47, 49, 53, 55, 58 и 100 а.о. от ПТЦ (рис.3). При этом ковалентная сшивка с NAC не препятствует ни дальнейшей элонгации синтезируемого полипептида, ни успешной терминации его синтеза и уходу из рибосомы [55].

На основании описанных экспериментов авторы делают вывод о том, что растущая полипептидная цепь защищена от протеолиза не рибосомным туннелем, а связанным с ней фактором NAC. В отсутствие NAC синтезируемый полипептид атакуется протеазой на расстоянии всего в 12 а.о. от ПТЦ, что несовместимо с локализацией растущей цепи во внутририбосомном туннеле.

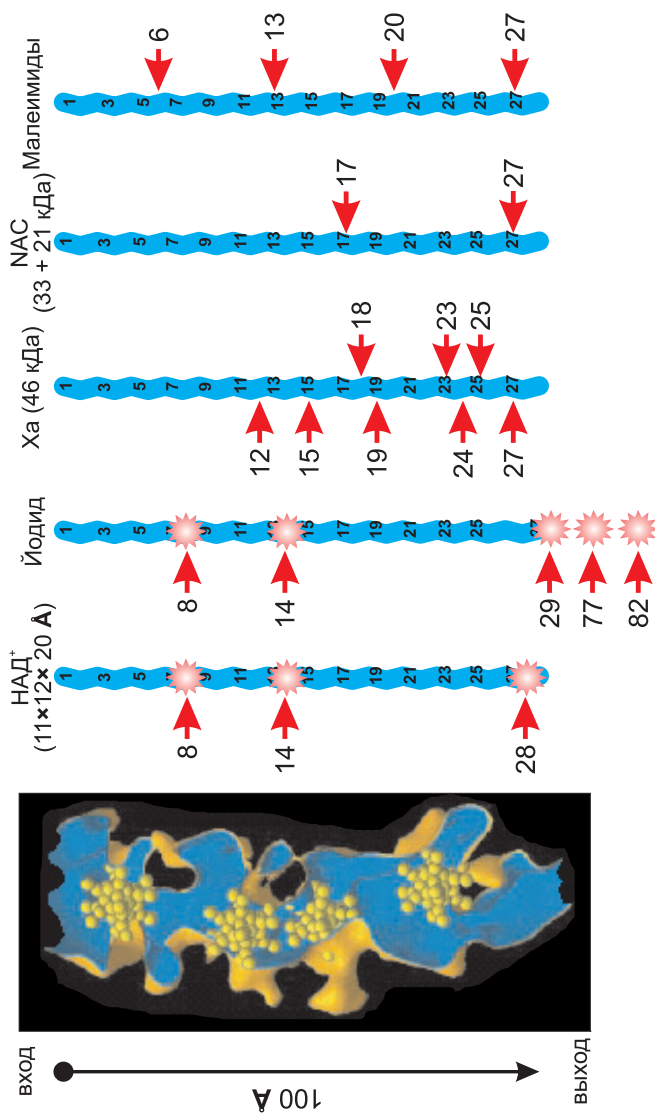


Рис. 3 Доступность синтезируемого пептида для взаимодействия с тушиллями флуоресценции и модифицирующими агентами. Слева приведен вид рибосомного туннеля в разрезе (плоскость сечения проходит по продольной оси). В туннеле присутствуют гетерополивольфраматы кластеры (показаны желтым, см. [41]). Растущие 28-членные полипептидные цепи (голубые ломаные) в полностью вытянутой конформации изображены в одном масштабе с туннелем (длина цепей и туннеля составляет 100 Å). Стрелками указаны доступные а.о., названия агентов приведены над соответствующей растущей цепью. Порядковый номер остатков приведен рядом со стрелкой (С-концевой остаток считается первым). Положение флуорофоров в составе цепей отмечено звездками. Пояснения и ссылки см. в тексте.

VI. КОНФОРМАЦИЯ РИБОСОМНОГО УЧАСТКА РАСТУЩЕГО ПОЛИПЕПТИДА

Одним из основных допущений, на котором основано размещение растущего полипептида внутри рибосомного туннеля, является допущение о полностью вытянутой конформации пептида внутри рибосомы. Явный недостаток такого допущения был отмечен в работе Лима и Спирина 1986 г. [56]. Очевидно, что полностью вытянутая цепь должна бы охотно взаимодействовать со своим РНК-белковым окружением за счет водородных связей, которые в этом случае образуются не между а.о. полипептида, а между полипептидом и его ближайшим окружением. Это, как уже отмечалось выше, могло привести к фиксации растущего пептида и затруднению дальнейшей элонгации. Такой сценарий становится, правда, менее вероятным, если принять во внимание отсутствие протяжённых заряженных (полярных) или гидрофобных участков на внутренней поверхности рибосомного туннеля [43]. Кроме того, полностью вытянутая конформация, когда на один а.о. приходится $3,6 \text{ \AA}$, является конформацией стерически напряженной. Для достижения этой конформации необходимо прилагать к пептиду растягивающее усилие, вряд ли существующее на рибосоме в процессе синтеза.

Перечисленных недостатков лишена полипептидная цепь, находящаяся в α -спиральной конформации. Преимуществом α -спиральной конформации является также ее стерическая приемлемость для любой аминокислотной последовательности: даже присутствие пролиновых остатков лишь незначительно искажает ее геометрические параметры [56]. Диаметр α -спирали незначительно превышает диаметр любой вытянутой структуры с боковыми цепями а.о., поэтому, если рибосомный канал вмещает вытянутый полипептид, то может вместить и α -спиральный.

На а.о. полипептида в α -спиральной конформации приходится $1,5 \text{ \AA}$. Соответственно, в туннеле длиной $100\text{--}120 \text{ \AA}$ может находиться $67\text{--}80$ а.о., что противоречит как результатам ограниченного протеолиза [4–6], так и данным по величине дополнительного С-концевого сегмента люциферазы [48–49]. Вывод, следующий из этого противоречия, таков: либо конформация растущей полипептидной цепи не является α -спиральной, либо растущая цепь проходит не сквозь рибосомный туннель. Авторы недавних работ [25–27] по криоэлектронной микроскопии рибосом, несущих полипептидные цепи заданной длины, не обнаружили в рибосоме растущего полипептида, находящегося целиком в α -спиральной конформации. Даже если достигнутое ими разрешение в действительности хуже заявленных 5.8 \AA

[25], маловероятно, что α -спираль из более чем 40 а.о. оказалась бы незамеченной. Скорее всего, весь внутририбосомный район растущего полипептида не находится в α -спиральной конформации, хотя образование небольших α -спиральных участков, приводящее к компактизации цепи и увеличению участка, защищаемого рибосомой от модификаций, показано [57–58].

VII. ДОСТУПНОСТЬ ВНУТРИРИБОСОМНОГО УЧАСТКА СИНТЕЗИРУЕМОЙ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Конформационное состояние, полярность окружения и доступность растущих полифенилаланиновых и полилизинных пептидных цепей малым молекулам исследовали с помощью флуоресцентных меток, присоединенных к N-концевому а.о. Результаты, полученные в лаборатории Хардести [59–61], выявили существенные различия в характеристиках растущих полифенилаланиновых и полилизинных пептидов. Так, N-конец полилизина на всём протяжении синтеза находился в гидрофобном полярном окружении, а анизотропия флуоресценции, резко снизившись в самом начале элонгации, оставалась низкой на протяжении всего процесса трансляции. Низкие значения анизотропии флуоресценции свидетельствуют о высокой подвижности молекулы, что плохо согласуется с её локализацией в туннеле внутри такой массивной частицы, как рибосома [59, 60]. N-конец растущего полифенилаланина, напротив, обнаруживал как присутствие гидрофобного окружения и экранированность от растворителя, так и достаточно высокую анизотропию флуоресценции, медленно увеличивающуюся в процессе элонгации после небольшого, но резкого падения в самом начале трансляции [59–61]. Авторы названных работ пришли к выводу о том, что уход из ПТЦ вызывает некоторое увеличение подвижности N-конца растущего полифенилаланина (падение анизотропии), но по мере элонгации пептид образует неструктурированный гидрофобный клубок, что также противоречит локализации его в туннеле.

Исследования доступности флуоресцентных меток в составе растущих пептидов молекулам различных тушителей флуоресценции также свидетельствуют против локализации синтезируемого рибосомой пептида во внутририбосомном туннеле. Так, N-концевые флуорофоры растущих цепей полиаланина, полисерина и полилизина, независимо от длины цепи, были практически одинаково доступны достаточно крупным молекулам тушителя метилвиологена (молекулярный вес 257, по размерам сравним с триптофаном) [62]. Очевидно, что

короткие растущие цепи, если бы они находились в туннеле, были бы менее доступны метилвиологену благодаря значительному уменьшению телесного угла, под которым флуорофор может быть атакован тушителем. Этого, однако, не наблюдалось.

В серии аналогичных по методологии работ группы Джонсона [63–65] были измерены времена жизни возбуждённого состояния флуорофора и величины константы Штерна-Фольмера, количественно отражающие эффективность тушения (доступность флуорофора для столкновений с молекулами тушителя). Флуорофор включали в состав растущего препролактина (как дикого типа, так и мутанта) на расстоянии в 8, 14, 29, 77 и 82 а.о. от ПТЦ [63] (рис.3). Эффективность тушения флуорофоров йодид-ионом была практически одинаковой независимо от их положения в последовательности синтезируемого препролактина, что свидетельствует о равной доступности участков растущего полипептида столкновениям с йодид-ионом. Очевидно, что возможность тушителя сталкиваться с полипептидом в узком туннеле должна быть существенно ухудшена по сравнению с пептидом, лежащим на плоскости. В действительности же значения константы Штерна-Фольмера для связанных с рибосомой флуоресцентно меченых пептидов всего в 1.5–2 раза меньше, чем для свободных [63] – результат, ожидаемый при уменьшении телесного угла атаки тушителя в 2 раза при посадке флуорофора из объёма на плоскость, а не помещения в туннель с диаметром в 15 Å. Только лишь присоединение рибосом с растущими пептидами к мембране изолирует растущий пептид от молекул цитоплазмы, и тушение флуоресценции йодидом становится невозможным как со стороны цитоплазмы [63], так и со стороны просвета ретикулума (для пептидов, не превышающих величины в 70 а.о.) [64].

Полная экранированность растущей цепи со стороны цитоплазмы [63, 64] в ассоциированной с мембраной рибосоме позволила авторам заключить, что цепь проходит сквозь внутририбосомный туннель. При этом собственные результаты по тушению флуорофора вблизи ПТЦ свободных рибосом были проигнорированы.

Техника флуоресцентного мечения растущих полипептидов была применена и для определения диаметра поры транслокона [65], что принесло неожиданный результат. В экспериментах были использованы молекулы разной величины, тушащие флуоресценцию при столкновении с флуорофором, в частности, никотинамид аденин динуклеотид (НАД⁺) имеющий в безводном состоянии размеры 11×12×20 Å. Флуорофоры размещались на разном удалении от С конца пептида. Для настоящего рассмотрения интересны 3 варианта

удаления: а) на 28 а.о., б) на 8 и 14 остатков в одной цепи, и в) на 1, 22 и 28 остатков в одной цепи (рис. 3). Удивительно, но практически одинаковая эффективность тушения флуоресценции НАД⁺ была зафиксирована для всех трёх вариантов расположения флуорофоров на препролактиновых пептидах свободных рибосом. Доступность тушению свободного флуорофора лишь в три раза превышала таковую рибосомо-связанного, что говорит о мало затруднённой диффузии такой крупной молекулы, как НАД⁺, вблизи растущего полипептида [65]. Очевидно, что туннель со средним диаметром в 15 Å, к тому же заполненный растущей цепью, должен был исключить диффузию в своём просвете молекулы с размерами в 11×12×20 Å, и, следовательно, полученные значения эффективности тушения не совместимы с локализацией растущей полипептидной цепи в туннеле большой рибосомной субъединицы.

Аномально высокая доступность внутририбосомного участка растущего полипептида была обнаружена также Лу с соавт. в работе [66], посвященной измерению электростатического потенциала в окрестностях растущей цепи («в рибосомном выходном туннеле», если точно цитировать авторов). В этой работе измеряли скорость, с которой цистеиновый остаток, находящийся в заданном положении в составе растущей цепи (и, следовательно, на заданном расстоянии от ПТЦ рибосомы), реагировал с модифицирующими сульфгидрильную группу соединениями. Это позволило, помимо вычисления электростатического потенциала, оценить доступность остатка для взаимодействия с замещёнными метантиосульфонатами и малеимидами. Оказалось, что остатки цистеина, расположенные на расстоянии в 6, 13, 20 и 27 а.о. от ПТЦ (рис. 3), реагируют с малеимидами с довольно высокой скоростью, составляющей приблизительно 1/10 от максимальной, характерной для остатков цистеина, находящихся вне рибосомы (на расстоянии в 67 и 74 а.о. от ПТЦ) [66]. Удивительно, но скорость реакции, а, значит, и доступность сульфгидрильной группы цистеина, практически не зависела от положения реагирующего остатка в диапазоне от 6 до 27 остатков от С конца [66]. Это означает, что диффузия относительно крупных молекул реагентов в окрестностях большей части растущего пептида происходила с одинаковой эффективностью, что плохо соответствует расположению растущей цепи в туннеле, допускающем попадание в него молекул из окружающего раствора только с одной стороны – со стороны домена выхода. Полученный результат выглядит ещё менее понятным, если принять во внимание уже упоминавшиеся данные криоэлектронной микроскопии [27], согласно которым у входа в туннель со стороны цитоплазмы

может возникать α -спиральная конформация растущего пептида. Очевидно, что спиральные участки послужили бы надёжными «пробками», предотвращающими контакт молекул из цитоплазмы с участками растущей цепи, расположенными между спиральным районом и ПТЦ.

Стерические ограничения, накладываемые туннелем, делают маловероятным также движение сквозь него растущего полипептида с массивной группой, ковалентно присоединённой к боковой цепи одного из а.о. Тем не менее, присоединение крупного флуорофора эозина ($11 \times 20 \text{ \AA}$) к N-концевому метионину не препятствовало синтезу хлорамфеникол-ацетилтрансферазы и роданезы, хотя и существенно замедляло инициацию трансляции (элонгация была замедлена в меньшей степени) [67]. Факт успешного синтеза энзиматически активных белков, модифицированных эозином по N концу, хорошо согласуется с результатами ковалентной сшивки растущего полипептида с НАС, не препятствующей ни дальнейшей элонгации синтезируемого полипептида, ни его терминации и уходу из рибосомы [55]. Оба наблюдаемых факта вызывают, таким образом, серьёзные сомнения в локализации растущей пептидной цепи в рибосомном туннеле.

Эксперименты по котрансляционному сворачиванию глобина также противоречат предположению о пролегающем в туннеле большой субъединицы пути растущего полипептида [68, 69]. Тестируя формирование нативной структуры α -глобина по способности растущей полипептидной цепи связывать гем, авторы обнаружили, что специфичное связывание лиганда происходит с растущими пептидами длиной в 140, 100 и 86 а.о., и не происходит с более короткими цепями длиной в 75, 65 и 34 остатка [69]. Это указывало на формирование растущим 86-членным полипептидом пространственной структуры, близкой к нативной структуре α -глобина.

Известно, что для связывания гема важны гистидиновые остатки в положении 58 и 87. Несмотря на отсутствие гистидина-87 у 86-членного фрагмента глобина, гем-связывающий карман был сформирован. Как следует из структуры нативного α -глобина, C-концевые остатки синтезированного 86-членного пептида формируют контакты, необходимые для связывания и удержания гема. Локализация этих остатков в туннеле рибосомы, вдалеке от формирующейся глобулы белка, воспрепятствовала бы их участию в связывании лиганда. Допущение о протекании процесса сворачивания внутри рибосомного туннеля и, как следствие, о локализации в нём свёрнутого 86-членного фрагмента глобина исключено по причине стерических ограничений

(возможность сворачивания синтезируемого белка в рибосомном туннеле проанализирована в работе [70]).

Направленные эксперименты по картированию ближайшего окружения растущей полипептидной цепи по мере её элонгации на рибосоме были проведены с помощью фотоактивируемой группы TDB, ковалентно связанной с N концом синтезируемых полипептидов различной величины и последовательности [71–74]. В этих работах были использованы N-концевые фрагменты следующих белков: белка устойчивости к тетрациклину, *otrA* из *E. coli* и белка, кодируемого геном 60 бактериофага T4 (субъединица ДНК-топоизомеразы). По мере элонгации пептиды последовательно давали сшивки с нуклеотидами доменов V, II, III, и I 23S рРНК [71–73]. Принимая во внимание, что начало туннеля образовано доменом V 23S рРНК (ПТЦ), его средняя часть – участками доменов II и IV, а дистальный район образован участками доменов I и III [43], можно заключить, что растущий пептид движется по туннелю к выходу из рибосомы. В то же время оказалось, что все исследованные пептиды (их размеры варьировали от 1 до 50 а.о.) сохраняли способность сшиваться с нуклеотидами домена V. Парадоксально, но пептиды топоизомеразы (ген 60) размером в 31, 47 и 50 остатков, давали сшивки как с доменом I, некоторые участки которого расположены на выходе из туннеля, так и с доменом V, находящимся у входа в туннель [73]. Более того, начиная с длины в 6 а.о., пептиды *otrA*, наряду с 50S субъединицей сшивались также и с 30S субъединицей [74]. Точно так же, как и пептиды *otrA*, N-концевые фрагменты топоизомеразы величиной в 30, 46 и 49 остатков давали сшивки с малой субъединицей рибосомы, причём с таким же выходом, что и с 50S субъединицей [74]. Авторы идентифицировали участки взаимодействия растущих цепей с малой субъединицей. Ими оказались белки S1, S2, S4 и S3 (в меньшей степени), расположенные (кроме S1) вблизи соединения «головы» и «тела» субъединицы, на её стороне, обращённой в сторону цитоплазмы [75]. Сшивок с 16S рРНК идентифицировать не удалось по причине низкой эффективности таковых [74]. Очевидно, что растущие цепи столь малой длины не способны «дотянуться» до белков 30S субчастицы и дать с ними сшивку, если они проходят внутри туннеля (рис. 4). Следовательно, синтезируемые пептиды сквозь туннель не проходят.

На основании результатов работ [71–74] авторы пришли к заключению о необычайной гибкости растущих полипептидных цепей, обладающих в процессе котрансляционного сворачивания такой подвижностью, что способны контактировать как с рибосом-

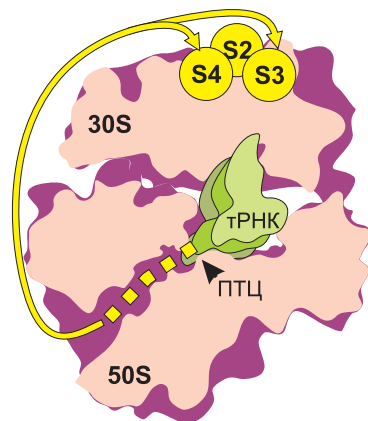


Рис. 4. Картирование контактов растущих полипептидных цепей с рибосомой при помощи N-концевых фотоактивируемых шшивков (по работе [74]). Обозначения такие же, как на рис. 1. Внутририбосомный участок растущей цепи (30–40 а.о.) показан желтым пунктиром. Желтыми линиями обозначен путь N конца пептидов от домена выхода из туннеля до белков малой субчастицы, дающих шшивки (отмечены желтыми кругами).

ным туннелем и выходом из него, так и с ПТЦ. Сворачивание растущего полипептида, по их мнению, происходит внутри туннеля. Однако определение морфологических характеристик туннеля с помощью РСА кристаллов рибосом и их субчастиц ясно показывает, что это невозможно: просвет туннеля слишком узок. Сворачивание (и вообще подвижность N конца цепи в трёх измерениях) в столь ограниченном пространстве маловероятно [70].

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Решение структуры рибосомы и её субчастиц методом РСА однозначно решило вопрос о существовании туннеля большой субъединицы и определило его морфологические характеристики. Вместе с тем, к настоящему времени нет надежных экспериментальных подтверждений тому, что внутририбосомный туннель служит для выхода растущей полипептидной цепи из рибосомы. Напротив, ряд приведенных выше данных вызывает сомнения в справедливости такой точки зрения. Суммируя возражения, можно сказать следующее:

а) место выхода растущего полипептида на рибосомную поверхность определено неоднозначно – имеется два различных результата локализации домена выхода;

б) конформация полностью вытянутой цепи у растущего полипептида маловероятна;

в) внутририбосомный туннель не экранирует растущий полипептид от взаимодействий с рядом белков и от столкновений с крупными молекулами тушителей флуоресценции;

г) диаметр внутририбосомного туннеля слишком мал, чтобы объяснить высокую подвижность растущей цепи, её котрансляционное сворачивание внутри туннеля и способность её N конца взаимодействовать с малой субъединицей рибосомы и с ПТЦ при длине в 30–50 а.о.

Допустимо предположение о том, что диаметр туннеля может изменяться в процессе трансляции и что у транслирующей рибосомы туннель просторнее, чем у находящейся в кристалле. Экспериментальных подтверждений этому предположению на сегодняшний день нет. Скорее наоборот, получено подтверждение того, что 50S субъединицы в кристалле активны, по крайней мере, в реакции транспептидации, но об изменениях морфологии туннеля до и после реакции авторы не сообщают [76].

Предположение о том, что сквозь рибосомный туннель проходят не все синтезируемые пептиды, и что туннель является регуляторным элементом, осуществляющим сортинг [77] или определяющим скорость трансляции [77, 78], более вероятно, но также нуждается в экспериментальной проверке. Имеющиеся данные по сшивкам пептидов разных семейств с компонентами рибосомы говорят скорее о сходстве, чем о различиях ближайшего окружения растущих полипептидных цепей с N-концевым сигнальным пептидом и без него [73, 74].

Роль туннеля в регулировании скорости трансляции была предложена на основании анализа мутаций, снимающих блокирование элонгации белка SecM, вызываемое, по предположению авторов [78], сужением туннеля. Мутации действительно были картированы в самом узком месте туннеля, в белке L22, но состояли в замене глицина-91 и аланина-93 на остатки с более крупными боковыми цепями. Иными словами, просвет туннеля должен был уменьшиться в результате мутаций. Убедительно преодолеть этот парадокс не удалось [78]. Впоследствии было выяснено, что блокирование элонгации растущего полипептида останавливающей последовательностью SecM не связано со стерическими препятствиями, мешающими продвижению цепи по туннелю, но вызваны событиями в ПТЦ рибосомы: находящаяся в А-участке пролиловая тРНК оказывается неспособной акцептировать пептид, расположенный в Р-участке и связанный с глициловой тРНК [79].

Роль внутририбосомного туннеля пока остаётся непонятной и малоизученной. Вероятно, что локализация растущих цепей на рибосоме будет окончательно определена с помощью рентгеновской кристаллографии. Прямое решение вопроса о взаимодействии растущего

полипептида со стенками туннеля и, как следствие, вопроса о функции этой части рибосомной структуры, также зависит от результатов РСА транслирующих рибосом.

* * *

Автор выражает глубокую признательность своим коллегам М.С.Светлову и А.Коммеру за критическое прочтение рукописи и конструктивные предложения по ее улучшению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Selmer, M., Liljas, A. (2008) Structure, **16**, 498–500.
2. Bernabeu, C., Lake, J.A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 3111–3115.
3. Bernabeu, C., Tobin, E.M., Fowler, A., Zabin, I., Lake, J.A. (1983) J. Cell Biol., **96**, 1471–1474.
4. Malkin, L.I., Rich, A. (1967) J. Mol. Biol., **26**, 329–346.
5. Blobel, G., Sabatini, D.D. (1970) J. Cell Biol., **45**, 130–145.
6. Smith, W.P., Tai, P.C., Davis, B.D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 5922–5925.
7. Lührmann, R., Bald, R., Stöffler-Meilicke, M., Stöffler, G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 7276–7280.
8. Olson, H.M., Grant, P.G., Cooperman, B.S., Glitz, D.G. (1982) J. Biol. Chem., **257**, 2649–2656.
9. Spirin, A.S., Vasiliev, V.D. (1989) Biol. Cell, **66**, 215–223.
10. Arad, T., Piefke, J., Weinstein, S., Gewitz, H.S., Yonath, A., Wittman, H.G. (1987) Biochimie, **69**, 1001–1005.
11. Yonath, A., Leonard, K.R., Wittmann, H.G. (1987) Science, **236**, 813–816.
12. Milligan, R.A., Unwin, P.N.T. (1986) Nature, **319**, 693–696.
13. Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A., Frank, J. (1987) EMBO J., **6**, 1107–1114.
14. Eisenstein, M., Sharon, R., Berkovitch-Yellin, Z., Gewitz, H.S., Weinstein, S., Pebay-Peyroula, E., Roth, M., Yonath, A. (1991) Biochimie, **73**, 879–886.
15. Yonath, A., Wittmann, H.G. (1989) Trends Biochem. Sci., **14**, 329–335.
16. Stark, H., Mueller, F., Orlova, E.V., Schatz, M., Dube, P., Erdemir, T., Zemlin, F., Brimacombe, R., van Heel, M. (1995) Structure, **3**, 815–821.
17. Stark, H., Orlova, E.V., Rinke-Appel, J., Jünke, N., Mueller, F., Rodnina, M., Wintermeyer, W., Brimacombe, R., van Heel, M. (1997) Cell, **88**, 19–28.
18. 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.
19. Frank, J., Verschoor, A., Li, Y., Zhu, J., Lata, R.K., Radermacher, M., Penczek, P., Grassucci, R., Agrawal, R.K., Srivastava, S. (1995) Biochem. Cell Biol., **73**, 757–765.
20. Yonath, A., Berkovitch-Yellin, Z. (1993) Curr. Opin. Struct. Biol., **3**, 175–181.
21. Verschoor, A., Srivastava, S., Grassucci, R., Frank, J. (1996) J. Cell Biol., **133**, 495–505.
22. Verschoor, A., Warner, J.R., Srivastava, S., Grassucci, R., Frank, J. (1998) Nucleic Acids Res., **26**, 655–661.

23. Morgan, D.G., Ménétret, J.-F., Radermacher, M., Neuhofer, A., Akey, I.V., Rapoport, T.A., Akey, C.W. (2000) *J. Mol. Biol.*, **301**, 301–321.
24. Dube, P., Weiske, M., Stark, H., Schatz, M., Stahl, J., Zemlin, F., Lutsch, G., van Heel, M. (1998) *Structure*, **6**, 389–399.
25. Seidelt, B., Innis, C.A., 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.
26. 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.
27. Bhushan, S., Gartmann, M., Halic, M., Armache, J.-P., Jarasch, A., Mielke, T., Berninghausen, O., Wilson, D., Beckmann, R. (2010) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 313–317.
28. Ryabova, L.A., Selivanova, O.M., Baranov, V.I., Vasiliev, V.D., Spirin, A.S. (1988) *FEBS Lett.*, **226**, 255–260.
29. Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., Frank, J. (1997) *Science*, **278**, 2123–2126.
30. van den Berg, B., Clemons, W. Jr, Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S., Rapoport, T. (2004) *Nature*, **427**, 36–44.
31. Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L. III, Ban, N., Frank, J. (2005) *Nature*, **438**, 318–324.
32. Schaffitzel, C., Oswald, M., Berger, I., Ishikawa, T., Abrahams, J.P., Koerten, H., Koning, R., Ban, N. (2006) *Nature*, **444**, 503–506.
33. Bingel-Erlenmeyer, R., Kohler, R., Kramer, G., Sandikci, A., Antolić, S., Maier, T., Schaffitzel, C., Wiedmann, B., Bukau, B., Ban, N. (2008) *Nature*, **452**, 108–113.
34. Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E., Ban, N. (2004) *Nature*, **431**, 590–596.
35. Baram, D., Pyetan, E., Sittner, A., Auerbach-Nevo, T., Bashan, A., Yonath, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12017–12022.
36. Adlagatta, A., Quillin, M.L., Omotoso, O., Liu, J.O., Matthews, B.W. (2005) *Biochemistry*, **44**, 7166–7174.
37. Adams, J.M. (1968) *J. Mol. Biol.*, **33**, 571–589.
38. Takeda, M., Webster, R. E. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 1487–1494.
39. Miyaguchi, K., Reese, T.S. (1996) *J. Struct. Biol.*, **116**, 413–417.
40. Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Grassucci, R.A., Sweet, R., Frank, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (1998) *Cell*, **93**, 1105–1115.
41. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B., Steitz, T.A. (1999) *Nature*, **400**, 841–847.
42. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 905–920.
43. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) *Science*, **289**, 920–930.
44. Cate, J., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Zh., Earnest, T.N., Noller, H.F. (1999) *Science*, **285**, 2095–2104.
45. Yusupov, M.M., Yusupova, G.Zh., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H.D., Noller, H.F. (2001) *Science*, **292**, 883–896.
46. Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., Yonath, A. (2001) *Cell*, **107**, 679–688.

47. Eisenstein, M., Hardesty, B., Odom, O.W., Kudlicki, W., Kramer, G., Arad, T., Franceschi, F., Yonath, A. (1994) In *Biophysical Methods in Molecular Biology*, Pifat G., ed. (Rehovot, Izrael: Balaban Press), pp. 213–246.
48. Makeyev, E., Kolb, V., Spirin, A. (1996) *FEBS Lett.*, **378**, 166–170.
49. Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Kommer, A., Spirin, A.S. (1995). *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 1217–1220.
50. Kolb, V., Makeyev, E., Spirin, A. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3631–3637.
51. Kolb, V., Makeyev, E., Spirin, A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 16597–16601.
52. Bornemann, T., Jöckel, J., Rodnina, M., Wintermeyer, W. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 494–499.
53. Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T.A., Wiedmann, M. (1994) *Nature*, **370**, 434–440.
54. Möller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Lauring, B., Wiedmann, M. (1998) *FEBS Lett.*, **441**, 1–5.
55. Wang, S., Sakai, H., Wiedmann, M. (1995) *J. Cell Biol.*, **130**, 519–528.
56. Lim, V.I., Spirin, A.S. (1986) *J. Mol. Biol.*, **188**, 565–574.
57. Lu, J., Deutsch, C. (2005) *Biochemistry*, **44**, 8230–8243.
58. Lu, J., Deutsch, C. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1123–1129.
59. Hardesty, B., Picking, W.D., Odom, O.W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1050**, 197–202.
60. Picking, W.D., Odom, O.W., Tsalkova, T., Serdyuk, I., Hardesty, B. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 1534–1542.
61. Odom, O.W., Picking, W.D., Tsalkova, T., Hardesty, B. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **198**, 713–722.
62. Picking, W.D., Picking, W.L., Odom, O.W., Hardesty, B. (1992) *Biochemistry*, **31**, 2368–2375.
63. Crowley, K.S., Reinhart, G.D., Johnson, A.E. (1993) *Cell*, **73**, 1101–1115.
64. Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D., Johnson, A.E. (1994) *Cell*, **78**, 461–471.
65. Hamman, B.D., Chen, J.-C., Johnson, E.E., Johnson, A.E. (1997) *Cell*, **89**, 535–544.
66. Lu, J., Kobertz, W., Deutsch, C. (2007) *J. Mol. Biol.*, **371**, 1378–1391.
67. Ramachandiran, V., Willms, C., Kramer, G., Hardesty, B. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 1781–1786.
68. Komar, A.A., Kommer, A., Krashe-ninnikov, I.A., Spirin, A.S. (1997) *FEBS Lett.*, **326**, 261–263.
69. Komar, A.A., Kommer, A., Krashe-ninnikov, I.A., Spirin, A.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 10646–10651.
70. Voss, N.R., Gerstein, M., Steitz, T.A., Moore, P.B. (2006) *J. Mol. Biol.* **360**, 893–906.
71. Stade, K., Riens, S., Bochkariov, D., Brimacombe, R. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1394–1399.
72. Stade, K., Junke, N., Brimacombe, R. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2371–2380.
73. Choi, K.M., Brimacombe, R. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 887–895.
74. Choi, K.M., Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Brimacombe, R. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **255**, 409–413.
75. Brodersen, D.E., Clemons, W.M. Jr., Carter, A.P., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V. (2002) *J. Mol. Biol.*, **316**, 725–768.
76. Schmeing, T.M., Seila, A.C., Hansen, J., Freeborn, B., Soukup, J.K., Scar-inge, S.A., Strobel, S.A., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2002) *Nature Struct. Biol.*, **9**, 225–230.
77. Tenson, T., Ehrenberg, M. (2002) *Cell*, **108**, 591–594.

-
78. Nakatogawa, H., Ito, K. (2002) *Cell*, **108**, 629–636.
79. Mito, H., Nakatogawa, H., Ito, K. (2006) *Molec. Cell*, **22**, 545–552.