

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ L12/P-ВЫСТУПА РИБОСОМЫ

©2016 г.

И. В. МИТРОШИН, М. Б. ГАРБЕР,
А. Г. ГАБДУЛХАКОВ

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Номенклатура рибосомных белков. III. Компоненты L12/P-выступа рибосомы. IV. Взаимозаменяемость бокового выступа бактерий, архей и эукариот. V. Кристаллографические исследования L12/P-выступа в составе рибосом. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В 1950-х годах были открыты клеточные органеллы, которые ответственны за биосинтез белка в клетке. Эти органеллы были названы рибосомами. Рибосома представляет собой макромолекулярный рибонуклеопротеидный комплекс. Рибосомная РНК (рРНК) определяет основные структурные и функциональные свойства рибосомы, но для нормального функционирования рибосомы необходимо наличие как рРНК, так и рибосомных белков.

Строение рибосом на ранних этапах исследовалось методами ультрацентрифугирования и электронной микроскопии. Эти исследования показали, что в определенных условиях (например, низкая концентрация ионов магния) рибосома диссоциирует на малую и большую субчастицы. Для большой субчастицы рибосомы характерны три периферических выступа: с одной стороны субчастицы расположен боковой пальцеобразный выступ (L12-выступ в бактериях и P-выступ в археях и эукариотах), посередине – центральный протуберанец, который можно назвать головкой большой субчастицы, и с другой стороны – боковой L1-выступ [1, 2].

В процессе биосинтеза белка рибосома взаимодействует с матричной РНК (мРНК), транспортными РНК (тРНК), факторами инициа-

Принятые сокращения: рРНК – рибосомная РНК, мРНК – матричная РНК, тРНК – транспортная РНК, IF2 – фактор инициации трансляции 2.

Адрес для корреспонденции: garber@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ции, элонгации и терминации трансляции и с другими лигандами [3]. Рабочий цикл рибосомы состоит из трех этапов: инициации, элонгации и терминации. Факторы трансляции способствуют белковому синтезу на каждом этапе рабочего цикла рибосомы. Боковой L12/P-выступ рибосомы способствует взаимодействию рибосомы с факторами элонгации и терминации трансляции, а L12-выступ бактерий участвует еще и в инициации трансляции, увеличивая скорость ассоциации малой и большой субчастиц рибосомы [4]. С помощью криоэлектронной микроскопии и последующей реконструкции структуры рибосомы показано, что в процессе элонгационного цикла рибосомы L12-выступ подвергается различным конформационным перестройкам.

II. НОМЕНКЛАТУРА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

Малая и большая рибосомные субчастицы содержат большое число индивидуальных белков. Практически все они представлены одной копией на рибосоме. Первая попытка систематизировать рибосомные белки была основана на стандартном экспериментальном методе, в качестве которого использовался двумерный электрофорез в геле. Этот наиболее удобный метод позволил полностью разделить рибосомные белки по заряду и размеру молекул (рис. 1) [5].

Первоначально рибосомные белки каждого вида организмов имели собственное обозначение, соответствующее их электрофоретическому разделению. В возникшей номенклатуре один и тот же номер мог принадлежать негомологичным белкам различных видов. При сравнении аминокислотных последовательностей рибосомных белков была найдена гомология между белками разных видов, а также было обнаружено, что большая часть рибосомных белков эволюционно консервативна [6]. Это позволило создать первоначальную номенклатуру для консервативных гомологичных белков бактерий, архей и эукариот.

С появлением полученных методами кристаллографии или криоэлектронной микроскопии моделей бактериальных, архейных и эукариотических рибосом отсутствие единого обозначения рибосомных белков стало затруднять сравнительный анализ структур. Для решения этой проблемы, в 2014 году была создана единая номенклатура рибосомных белков всех доменов жизни (таблица) [7]. В основу новой номенклатуры легло обозначение рибосомных белков *E. coli*, поскольку впервые рибосомные белки были выделены именно из этого организма, их аминокислотные последовательности стали известны раньше последовательностей других рибосомных белков,

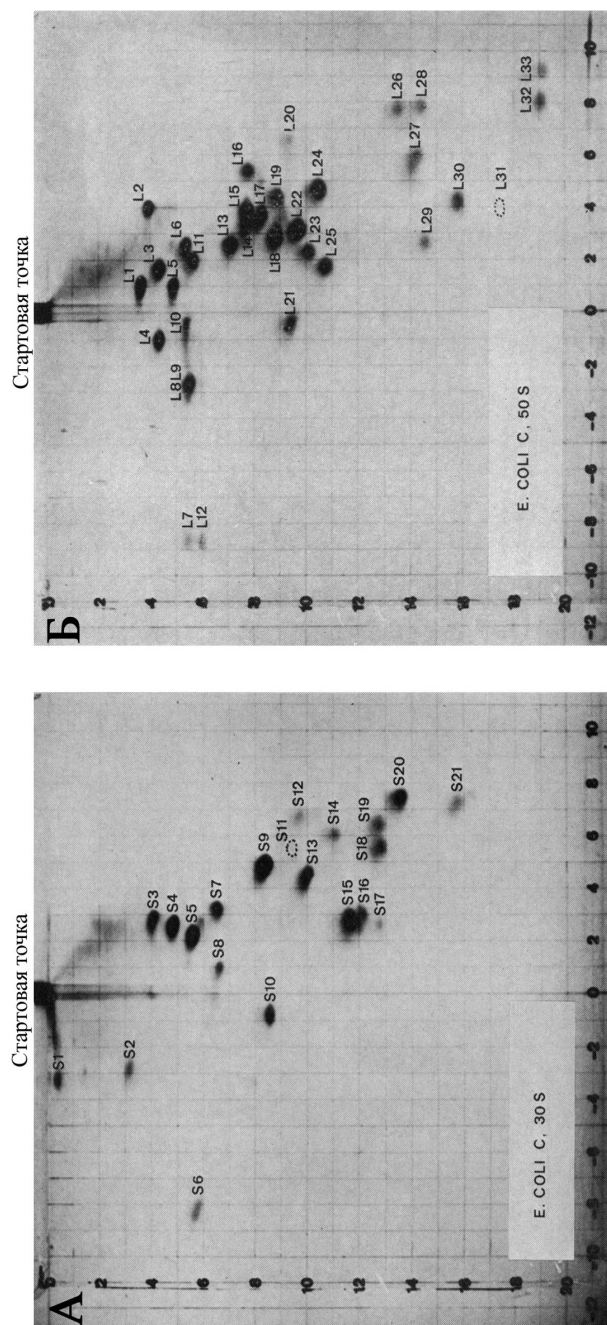


Рис. 1. Разделение рибосомных белков 30S (А) и 50S (Б) субчастиц рибосомы *Escherichia coli* с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и номенклатура этих белков. Первое направление – горизонтальное, второе направление – вертикальное (сверху вниз). Белки малой субчастицы рибосомы обозначены буквой S (от англ. «Small»), а белки большой субчастицы – буквой L (от англ. «Large») (рисунки с небольшими изменениями взяты из работы [5]).

Таблица. Старая и новая номенклатуры рибосомных белков
(таблица взята с изменениями из работ [7, 8]).

Рибосомные белки малой субчастицы					Рибосомные белки большой субчастицы				
Новое название#	Домены жизни*	Старое название			Новое название#	Домены жизни*	Старое название		
		Бактерии	Археи	Эукариоты			Бактерии	Археи	Эукариоты
bS1	Б	S1	—	—	uL1	БАЭ	L1	L1	L1/L10A [^]
eS1	АЭ	—	S3ae	S1/S3A [^]	uL2	БАЭ	L2	L2	L2/L8 [^]
uS2	БАЭ	S2	S2	S0/SA [^]	uL3	БАЭ	L3	L3	L3
uS3	БАЭ	S3	S3	S3	uL4	БАЭ	L4	L4	L4
uS4	БАЭ	S4	S4	S9	uL5	БАЭ	L5	L5	L11
eS4	АЭ	—	S4e	S4	uL6	БАЭ	L6	L6	L9
uS5	БАЭ	S5	S5	S2	eL6	Э	—	—	L6
bS6	Б	S6	—	—	eL8	АЭ	—	L8e	L8/L7A [^]
eS6	АЭ	—	S6e	S6	bL9	Б	L9	—	—
uS7	БАЭ	S7	S7	S5	uL10	БАЭ	L10	P0	P0
eS7	Э	—	—	S7	uL11	БАЭ	L11	L11	L12e
uS8	БАЭ	S8	S8	S22/S15A [^]	bL12	Б	L12	—	—
aS8	А	—	L7ae	—	uL13	БАЭ	L13	L13	L16/L13A [^]
eS8	АЭ	—	S8e	S8	eL13	АЭ	—	L13e	L13
uS9	БАЭ	S9	S9	S16	uL14	БАЭ	L14	L14	L23
uS10	БАЭ	S10	S10	S20	eL14	АЭ	—	L14e	L14
eS10	Э	—	—	S10	uL15	БАЭ	L15	L15	L28/L27A [^]
uS11	БАЭ	S11	S11	S14	eL15	АЭ	—	L15e	L15
uS12	БАЭ	S12	S12	S23	uL16	БАЭ	L16	L16	L10
eS12	АЭ	—	S12e	S12	bL17	Б	L17	—	—
uS13	БАЭ	S13	S13	S18	uL18	БАЭ	L18	L18	L5
uS14	БАЭ	S14	S14	S29	eL18	АЭ	—	L18e	L18
uS15	БАЭ	S15	S15	S13	bL19	Б	L19	—	—
bS16	Б	S16	—	—	eL19	АЭ	—	L19e	L19
uS17	БАЭ	S17	S17	S11	bL20	Б	L20	—	—
eS17	АЭ	—	S17e	S17	eL20	АЭ	—	LX	L20/L18A [^]
bS18	Б	S18	—	—	bL21	Б	L21	—	—
uS19	БАЭ	S19	S19	S15	eL21	АЭ	—	L21e	L21
eS19	АЭ	—	S19e	S19	uL22	БАЭ	L22	L22	L17
bS20	Б	S20	—	—	eL22	Э	—	—	L22

Окончание таблицы см.на сл. стр.

Окончание таблицы

Рибосомные белки малой субчастицы					Рибосомные белки большой субчастицы				
Новое название#	Домены жизни*	Старое название			Новое название#	Домены жизни*	Старое название		
		Бактерии	Археи	Эукариоты			Бактерии	Археи	Эукариоты
bS21	Б	S21	—	—	uL23	БАЭ	L23	L23	L25/L23A^
eS21	Э	—	—	S21	uL24	БАЭ	L24	L24	L26
eS24	АЭ	—	S24e	S24	eL24	АЭ	—	L24e	L24
eS25	АЭ	—	S25e	S25	bL25	Б	L25	—	—
eS26	Э	—	—	S26	bL27	Б	L27	—	—
eS27	АЭ	—	S27e	S27	eL27	Э	—	—	L27
eS28	АЭ	—	S28e	S28	bL28	Б	L28	—	—
eS30	АЭ	—	S30e	S30	uL29	БАЭ	L29	L29	L35
eS31	АЭ	—	S27ae	S31/ S27A^	eL29	Э	—	—	L29
					uL30	БАЭ	L30	L30	L7
					eL30	АЭ	—	L30e	L30
					bL31	Б	L31	—	—
					eL31	АЭ	—	L31e	L31
					bL32	Б	L32	—	—
					eL32	АЭ	—	L32e	L32
					bL33	Б	L33	—	—
					eL33	АЭ	—	L33e	L33/L35^
					bL34	Б	L34	—	—
					eL34	АЭ	—	L34e	L34
					bL35	Б	L35	—	—
					bL36	Б	L36	—	—
					eL36	Э	—	—	L36
					eL37	АЭ	—	L37e	L37
					eL38	АЭ	—	L38e	L38
					eL39	АЭ	—	L39e	L39
					eL40	АЭ	—	L40e	L40
					eL41	АЭ	—	L41e	L41
					eL42	АЭ	—	L44e	L42/ L36A^
					eL43	АЭ	—	L43e	L43/ L27A^
					P1/P2	АЭ	—	P1	P1/P2

b – бактериальный, e – эукариотический, a – архейный, u – универсальный.

* Б – бактерии, А – археи, Э – эукариоты.

^ обозначены дрожжевые/человеческие эукариотические рибосомные белки

а также эти белки были наиболее подробно описаны в литературе. Белкам, которые обнаружены в рибосомах всех доменов жизни, была присвоена приставка «u» (от английского «universal») и нумерация белков *E. coli*. Бактериальные белки, у которых не обнаружено гомологов среди архей и эукариот, были обозначены приставкой «b» (от английского «bacterial»). Архейным рибосомным белкам, которые не имеют гомологов в бактериальной и эукариотической рибосомах, была приписана приставка «a» (от английского «archaeal»). Приставка «e» (от английского «eukaryotic») была добавлена не только для обозначения эукариотических рибосомных белков, для которых не найдены бактериальные и архейные гомологи, но также и для гомологичных им архейных белков.

В предложенной номенклатуре рибосомные белки L12/P-выступа приобрели новое обозначение. Бактериальный белок L10 и его архейный и эукариотический гомологи P0 было предложено обозначать как uL10, а бактериальный белок L12 – как bL12. В археях и эукариотах не обнаружено гомологов бактериального белка L12, но имеются его функциональные аналоги, называемые белками eP1/P2 в эукариотах и aP1 в археях. Соответственно, этот боковой выступ у архей и эукариот обозначается теперь как P-выступ. Бактериальный и архейный белки L11 и их эукариотический аналог, белок L12e, предложено обозначать как uL11.

Далее в обзоре будет использоваться более подробная номенклатура. Так, чтобы различать «универсальные» белки uL10 и uL11, кроме префикса «u» будут также использоваться префиксы «b», «a» и «e», которые будут обозначать принадлежность белка к бактериям, археям или эукариотам, соответственно.

III. КОМПОНЕНТЫ L12/P-ВЫСТУПА РИБОСОМЫ

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БЕЛКИ bL10, bL11 И bL12

Рибосомные белки bL10, bL11 и bL12 вместе с фрагментом домена II 23S рРНК образуют характерный морфологический выступ бактериальной рибосомы, называемый L12-выступом. Двух-стадийная обработка большой рибосомной субъединицы *E. coli* 1 M NH₄Cl и 50% этанолом при 0°C и 37°C позволяет полностью удалить эти белки из рибосомы [8].

Рибосомный белок bL12

Рибосомный белок bL12 является одним из первых белков, выделенных из рибосомы. Это единственный белок большой субчастицы рибосомы, который представлен в нескольких копиях [9]. В рибосомах *E. coli* присутствует также ацетилированный вариант этого белка, который по первоначальной номенклатуре был обозначен как рибосомный белок L7 [5]. bL7 является точной копией рибосомного белка bL12, единственным отличием является то, что bL7 ацетилирован по N-концевому остатку серина [10]. Из-за близкого сходства эти белки ранее в литературе упоминались как белок bL7/L12. Соотношение белков bL7 : bL12 в клетке не постоянно и зависит от фазы роста клеток. В ранней логарифмической фазе роста клеток *E. coli* в рибосомах присутствие белка bL7 минимально. Увеличение его количества наблюдается при переходе из логарифмической фазы роста клеток в стационарную фазу [11, 12].

В процессе инициации трансляции белок bL12 необходим для узнавания фактора инициации трансляции 2 (IF2) в комплексе с ГТФ в составе 30S преинициаторного комплекса. Результатом такого взаимодействия является увеличение скорости ассоциации малой и большой рибосомных субчастиц [4].

Скорость трансляции и уровень ошибок в процессе биосинтеза белка на рибосомах зависят от наличия белка bL12 [13, 14]. Удаление этого рибосомного белка из рибосомы затрудняет связывание факторов элонгации EF1A и EF2 с рибосомой [15] и затрагивает другие фактор-зависимые функции, например, связывание аминоацил-тРНК с А-сайтом рибосомы, транслокацию, и, как следствие, гидролиз ГТФ [16, 17].

Белок bL12 обладает уникальными свойствами среди бактериальных рибосомных белков. Помимо того что bL12 является мультикопийным белком, его изоэлектрическая точка находится в кислой области (рН 4.8) [18]. В водном растворе изолированный белок bL12 существует только в виде димера [19] или тетрамера [20].

Рибосомный белок bL12 состоит из двух доменов и длинной гибкой перетяжки [21–23]. С-концевой домен белка bL12 (bL12CTD) ответственен за взаимодействие с факторами трансляции [24, 25], а N-концевой домен белка bL12 (bL12NTD) – за димеризацию и связывание с рибосомным белком bL10 [21]. N- и С-концевые домены bL12 соединены между собой гибкой перетяжкой, которая обеспечивает подвижность молекулы белка [26]. Длина этой перетяжки влияет не только на подвижность двух доменов друг относительно друга, но

и на связывание факторов элонгации, гидролиз ГТФ на рибосоме, скорость и точность трансляции [27, 28]. Удаление этого участка приводит к инактивации белка bL12 [28].

В 1980 году был закристаллизован С-концевой домен белка bL12 из *E. coli* и определена его структура с разрешением 2.6 Å [29]. Это была первая кристаллическая структура рибосомного белка. Значительно позднее появилась пространственная структура полноразмерного белка bL12 из *Thermotoga maritima* с разрешением 2.0 Å [30]. bL12NTD содержит две коротких спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$. Длинная шарнирная спираль $\alpha 3$ представляет собой перетяжку, которая отделяет N-концевой домен от глобулярного С-концевого домена. Эта спираль образована 20 аминокислотными остатками, преимущественно гидрофобными. С-концевой домен белка bL12 имеет плотную упаковку и состоит из трех-тяжевого антипараллельного β -листа, окруженного с одной стороны тремя α -спиралями [30].

В 2004 году определена пространственная структура димера белка bL7, N-ацетилированного варианта белка bL12 из *E. coli*, методом ядерного магнитного резонанса в растворе (ЯМР) [26]. Белок bL7 находится в вытянутой конформации. Данная структура димера белка bL7 сильно отличается от кристаллической структуры белка bL12 из *T. maritima* в области перетяжки. Гибкая перетяжка в структуре каждого мономера белка bL7 не имеет определенной структурной укладки. Определенная методом ЯМР структура димера белка bL7 позволила определить способ димеризации белка в растворе (рис. 2). Димеризация белка bL7 происходит за счет контакта двух антипараллельных V-образных α - α -шпилек N-концевого домена, которые образуют симметричный четырех-спиральный узел.

На основании полученных структур белка bL12 из *T. maritima* и димера белка bL7 из *E. coli* была предложена модель молекулярного переключения между двумя состояниями белка. Эта модель предполагает, что участок в области перетяжки белка bL12 может выполнять роль молекулярного переключателя: молекула принимает или «закрытую», компактную конформацию, когда фактор элонгации связан с рибосомой, или «открытую», вытянутую конформацию после гидролиза ГТФ и освобождения фактора элонгации из рибосомы [26].

Димеры белка bL12 связываются с рибосомным белком bL10, образуя в растворе прочный комплекс рибосомных белков bL10-bL12. Термостабильность белков bL10 и bL12 в комплексе повышается по сравнению с индивидуальным состоянием [31]. Комплекс bL10-bL12 из *E. coli* остается стабильным в присутствии 6 М мочевины при значении pH 4.6. В связи с этим при систематизации рибосомных

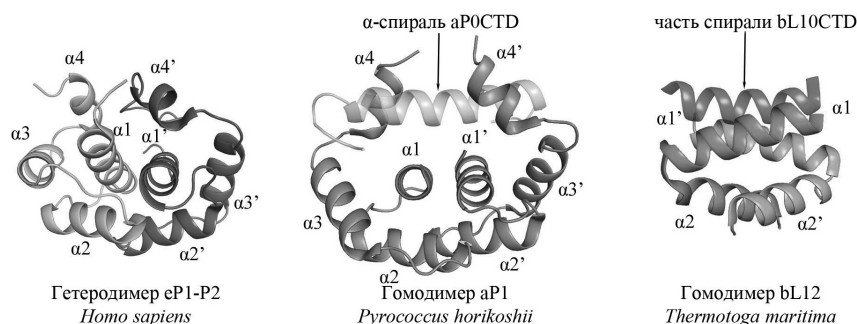


Рис. 2. Структурное сравнение способов димеризации эукариотических белков eP1/P2, архейного белка aP1 и бактериального белка bL12 (рисунок с небольшими изменениями взят из работы [34]).

белков методом двумерного электрофореза сохранившийся в денатурирующих условиях комплекс белков bL10-bL12 был ошибочно принят за индивидуальный белок, которому было присвоено название L8 [32].

Для комплекса рибосомных белков bL10-bL12 из *E. coli* было установлено соотношение белков bL10 и bL12 как 1 : 4 методами изотопного разведения [33], равновесного ультрацентрифугирования и количественного анализа пятен белков на электрофореграмме [31]. Поэтому долгое время считалось, что бактериальный комплекс рибосомных белков bL10-bL12 может существовать только в виде пентамера. Появление кристаллической структуры рибосомного комплекса bL10-bL12NTD из *T. maritima* изменило представление о соотношении белков bL10 и bL12. В данной структуре комплекса шесть молекул N-концевого домена белка bL12 образовали с одной молекулой белка bL10 гептамерный комплекс [34]. В связи с этим было выдвинуто предположение, что разница между соотношением белков в bL10-bL12 комплексах зависит от природы организма, из которого выделены белки, и дополнительная аминокислотная последовательность в С-концевом домене белка bL10 термофильных бактерий может быть местом связывания для третьего димера белка bL12 [35]. Результаты, полученные методом масс-спектрометрии, подтвердили это предположение. Было показано, что комплексы bL10-bL12 из мезофильных бактерий являются пентамерными, а из термофильных бактерий – исключительно гептамерными [35, 36].

Рибосомный белок bL10

Рибосомный белок bL10 играет роль моста между димерами белка bL12 и рибосомой. С-концевая часть белка bL10 мезофильных бактерий содержит два независимых сайта связывания для димеров белка bL12, тогда как N-концевой частью белок bL10 взаимодействует с 23S рРНК [22].

Кристаллическая структура комплекса рибосомного белка bL10 с димерами N-концевого домена белка bL12 из *T. maritima* была определена с разрешением 2.3 Å [34]. Белок bL10 состоит из двух доменов: N-концевого РНК-связывающего домена и С-концевого домена, с которым связывается белок bL12. N-концевой домен имеет плотную упаковку и содержит α/β мотив. С-концевой домен белка bL10 образован длинной и гибкой С-концевой α -спиралью (спираль $\alpha 8$). Спираль $\alpha 8$ изгибается дважды, формируя три сегмента из 10 аминокислотных остатков. Каждый сегмент связывает один димер bL12NTD, поэтому в области контакта белков bL10 и bL12 можно выделить три практически идентичных элемента [34]. Между N- и С-концевыми доменами белка bL10 находится, так называемый, «центр вращения». Благодаря этому «центру вращения» обеспечивается высокая подвижность спирали $\alpha 8$ с димерами bL12NTD относительно РНК-связывающего домена, необходимая для функциональной активности бокового L12-выступа [34].

Место связывания белка bL10 с рибосомой расположено на поверхности большой субчастицы рибосомы. Методом химического пробинга был определен основной участок связывания белка bL10, который расположен в домене II 23S РНК и включает спирали H42–44 [37]. Чтобы локализовать сайт связывания белка bL10 с 23S рРНК было проведено наложение по консервативному РНК-связывающему домену известной структуры бактериального белка bL10 из *T. maritima* на структуру двух N-концевых α -спиралей архейного белка aL10, которая определена в составе 50S рибосомной субчастицы из археи *Haloarcula marismortui* [34, 38]. На основании этих данных обнаружено, что наибольшее количество контактов образуется между спиралями $\alpha 1$ и $\alpha 2$ белка bL10 и спиралью H42 23S рРНК, что хорошо согласуется с данными химического пробинга [34, 37]. Стоит отметить, что большая часть контактов белка bL10 с 23S рРНК приходится на сахарофосфатный остов рРНК. Вероятно, пространственная укладка рРНК играет ключевую роль в узнавании места связывания белка uL10 в рибосомах всех организмов [34].

Гены бактериальных рибосомных белков bL10 и bL12 расположены в одном опероне. Рибосомный белок bL10 в составе комплекса bL10-bL12 является трансляционным репрессором своего оперона и связывается с мРНК выше инициаторного кодона гена белка bL10 [39, 40].

При анализе рРНК в кристаллической структуре большой субчастицы рибосомы из *Deinococcus radiodurans* в районе ГТФазного центра был выделен консенсусный мотив в спирали H42 23S рРНК, называемый «излом-поворот» (от английского «kink-turn motif»), который, возможно, вносит основной вклад в узнавание рРНК белком bL10 [41, 42]. мРНК гена *rplJ* из *E. coli* потенциально может содержать такой же мотив [43]. Предполагается, что мРНК и рРНК взаимодействуют с белком bL10 схожим образом.

Рибосомный белок bL11 связывается с 23S рРНК рядом с сайтом связывания белка bL10. Связывание белков bL10 и bL11 происходит кооперативно [44]. Кооперативный эффект может увеличивать сродство bL10 к рРНК в 100 раз [43]. Возможно, что кооперативное связывание bL10 и bL11 обусловлено конформационными изменениями в структуре рРНК [34]. Несмотря на то, что в экспериментах *in vitro* мРНК и рРНК связывались с белком bL10 с одинаковым сродством, 100-кратный кооперативный эффект связывания bL10 и bL11 с рРНК гарантирует, что рибосомы будут практически полностью заняты комплексом белков bL10-bL12 [43].

Рибосомный белок bL11

Рибосомный белок bL11 является необходимым компонентом рибосомной 50S субчастицы и расположен в основании L12-выступа. Мутантные штаммы клеток *Bacillus megaterium*, лишённые белка bL11, жизнеспособны, но их рост замедлен более чем в два раза по сравнению с клетками штамма дикого типа [45]. Белок bL11 выполняет схожую с белком bL12 функцию на рибосоме – участвует во взаимодействии рибосомы с факторами элонгации EF1A и EF2, с факторами терминации RF1 и RF2, способствует ассоциации субчастиц рибосомы, а также стимулирует гидролиз ГТФ [46]–[48].

В настоящее время определены пространственные структуры полноразмерного белка bL11 из *T. maritima* в свободном состоянии методом ЯМР в растворе [49] и в комплексе с фрагментом 23S рРНК методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.6 Å [50], а также структура 50S субчастицы рибосомы из *Deinococcus radiodurans* в комплексе с антибиотиком тиострептоном, в которой визуализирован белок bL11, с разрешением 3.3 Å [51].

Рибосомный белок bL11 состоит из N- и C-концевых глобулярных доменов, которые соединены короткой перетяжкой. Спираль $\alpha 1$ N-концевого домена белка bL11 имеет консервативный остаток пролина (Pro22, нумерация по *T. maritima*), с которым взаимодействуют антибиотики тиазольного класса (например, тиострептон и микрококцин). Перетяжка между доменами bL11 образована консенсусным мотивом из трех аминокислотных остатков (Thr72–Pro73–Pro74). Структура C-концевого домена (bL11CTD) имеет характерную особенность, а именно протяженную неупорядоченную петлю (84–96 а. о.). Эта петля вовлечена в РНК-белковое взаимодействие и подвержена конформационным изменениям при связывании рРНК [49, 50].

С помощью C-концевого домена белок bL11 взаимодействует с большой рибосомной РНК. Методом связывания на фильтрах установлено, что константа диссоциации для белка и рРНК равна 1.2×10^{-9} М [52]. C-концевой домен белка bL11 связывается с малым желобком 23S рРНК, образованным спиралями H43–44. РНК-связывающая поверхность белка bL11 образована спиралью $\alpha 5$, N-концевой частью спирали $\alpha 3$, а также петлями $\alpha 3$ – $\beta 4$ и $\alpha 4$ – $\alpha 5$, которые расположены по бокам спирали $\alpha 5$. Спираль $\alpha 5$ расположена вдоль малого желобка 23S рРНК, образуя наибольшее количество контактов. Петли $\alpha 3$ – $\beta 4$ и $\alpha 4$ – $\alpha 5$ при связывании с рРНК приобретают упорядоченную структуру, которая повторяет поверхность малого желобка рРНК [50]. Больше половины водородных связей комплекса образовано между сахарофосфатным остовом рРНК и основной цепью bL11CTD. Этот факт указывает на то, что пространственная укладка 23S рРНК играет основную роль в узнавании места связывания белком bL11. С помощью биофизических экспериментов показано, что белок bL11 стабилизирует третичную структуру рРНК посредством C-концевого домена [53]. N-концевой домен белка bL11 (bL11NTD) участвует во взаимодействии с факторами трансляции.

Рибосомный комплекс белка bL11 с 23S рРНК служит мишенью для тиазольного класса антибиотиков [54]. При связывании с рибосомой тиострептон блокирует, а микрококцин – стимулирует гидролиз ГТФ на EF2 [55]. Основной сайт связывания тиострептона/микрококцина расположен в щели между спиралью $\alpha 1$ bL11NTD и 1067/1095 участком рРНК. Таким образом, антибиотик тиострептон блокирует функционально важные структурные перестройки bL11 с помощью образования стабильного комплекса bL11–рРНК–тиострептон.

БЕЛКИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО И АРХЕЙНОГО Р-ВЫСТУПА

Эукариотические и архейные рибосомы содержат боковой Р-выступ, структурная организация которого аналогична бактериальному L12-выступу. Эукариотический рибосомный Р-выступ образован двумя типами Р-белков и белком eL11. Белок eL10 относится к первому типу Р-белков (ранее обозначался как P0) [56]. Второй тип включает небольшие кислые белки eP1/P2 размером около 11 кДа [57]. Р-белки образуют между собой пентамерный комплекс eL10–eP1/P2, в котором два гетеродимера eP1/P2 связываются с белком eL10. Эукариотический Р-выступ является необходимым компонентом рибосомы, а белок eL10 жизненно важен для роста клеток [58].

В археях Р-выступ состоит из рибосомных белков aL11, aL10 и aP1. Архейные белки aL10 и aP1 по аминокислотной последовательности и размеру намного ближе к эукариотическим белкам eL10 и eP1/P2, чем к бактериальным аналогам [59].

Архейный Р-выступ достаточно стабилен. Белки aL10 и aP1 образуют прочный белковый комплекс aL10–aP1, который, как и бактериальный комплекс bL10–bL12, не разрушается в 6 М мочеvine при pH 4.6. При обработке большой субчастицы архейной рибосомы раствором с высокой концентрацией NH_4Cl и этанолом белок aL10 не удаляется полностью с рибосомы, поскольку взаимодействует с рРНК с большим сродством, чем белок bL10 [60].

Рибосомные белки eP1/P2 и aP1

Эукариотические белки eP1/P2 между собой очень похожи, как функционально, так и структурно. В разных видах организмов присутствует разное количество групп и подгрупп белков eP1/P2 [61, 62]. В отличие от бактериального белка bL12 из *E. coli*, который представлен на рибосоме еще дополнительной N-ацетилированной копией, каждый тип белка eP1/P2 кодируется отдельным геном [61]. В растворе eP1/P2 белки находятся в виде стабильного гетеродимера [63, 64].

Архейный белок aP1 кодируется только одним геном в археях и не подвержен модификациям, несмотря на то, что имеет структурное сходство с эукариотическими белками eP1/P2. В растворе, а также на рибосоме, белок aP1 находится в виде димера [60, 65].

Структурно архейный aP1 и эукариотический eP1/P2 можно разделить на N- и C-концевой домены и гибкую перетяжку, которая соединяет оба домена (аналогично бактериальному белку bL12). И также как в bL12, N-концевой домен ответственен за димеризацию этих белков и за связывание их с рибосомной субчастицей через белок a/eL10 [66, 67].

В процессе биосинтеза белка архейный белок aP1 выполняет функцию доставки факторов трансляции на рибосому. С-концевая часть белка напрямую взаимодействует с элонгационными факторами aEF2 и aEF1 α , а также с фактором инициации aIF5B, который является гомологом бактериального фактора инициации IF2 [68, 69]. Методом поверхностного резонанса плазмонов показано, что белок aP1 связывает фактор элонгации aEF2 независимо от того, находится ли фактор в комплексе с ГТФ или ГДФ. Более того, белковый комплекс aL10•(aP1)₆ способен связывать несколько молекул aEF2, что способствует увеличению скорости доставки aEF2 в ГТФаза-связывающий центр и высокой скорости гидролиза ГТФ [69].

Первые десять аминокислотных остатков эукариотического белка eP1/P2 важны для гетеродимеризации и образования пентамерного комплекса [70]. С-концевой домен белка eP1/P2 ответственен за взаимодействие рибосомы с факторами трансляции [71].

В настоящее время определена пространственная структура полноразмерного гетеродимера eP1/P2 из *Homo sapiens* методом ЯМР в растворе [72]. N-концевые домены белков eP1 и eP2 состоят из четырех α -спиралей и достаточно компактны (рис. 2). Гетеродимер N-концевых доменов eP1 и eP2 ассиметричен и образован за счет высококонсервативных гидрофобных остатков спиралей $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 4$ белков eP1 и eP2. Основной контакт расположен между спиральями $\alpha 1$ белков eP1 и eP2. С-концевая часть не имеет определенной структуры. В результате С-концевой «хвост» димера eP1-eP2 может быть на расстоянии до 125 Å от N-концевого домена. Благодаря вытянутому С-концевому «хвосту» eP1/P2, факторы элонгации трансляции, по-видимому, могут беспрепятственно быть доставлены в ГТФаза-связывающий центр [72].

Структура полноразмерного архейного белка aP1 неизвестна, но определены кристаллические структуры димеров N-концевого домена белка aP1 (в комплексе с белком aL10; разрешение 2.1 Å) [67] и С-концевого домена белка aP1 (в комплексе с фактором элонгации aEF1 α ; разрешение 2.3 Å) из *Pyrococcus horicoshii* [73]. N-концевой домен архейного белка aP1 образован четырьмя α -спиральями (рис. 2). Димеризация белка aP1 происходит благодаря гидрофобным взаимодействиям между спиральями $\alpha 1$ и $\alpha 2$ двух мономеров. В отличие от компактного С-концевого домена бактериального bL12, С-концевой домен архейного aP1 (aP1CTD) неструктурирован в свободном от фактора элонгации состоянии [74], но при взаимодействии с трансляционными факторами aP1CTD структурируется с образованием длинной α -спирали [73].

Структуры архейного димера N-концевого домена aP1 и эукариотического гетеродимера N-концевых доменов eP1 и eP2 имеют схожую укладку полипептидных цепей в отличие от бактериального димера N-концевого домена белка bL12 (рис. 2). Основные отличия в структурах димера aP1NTD и гетеродимера eP1/P2NTD заключены в спирали $\alpha 4$. Спираль $\alpha 4$ aP1NTD в структуре архейного комплекса aL10•(aP1)₆ принимает «открытую» конформацию, которая позволяет связываться с короткой спиралью белка aL10. Спираль $\alpha 4$ в эукариотическом димере eP1/P2NTD принимает «закрытую» конформацию, но, вполне вероятно, эта спираль может принимать и «открытую» конформацию, и в таком состоянии способствует связыванию гетеродимера eP1/P2 с C-концевой частью эукариотического белка eL10 [66].

Поверхность спирали $\alpha 3$ эукариотического белка eP1 сильно гидрофобна, тогда как поверхность спирали $\alpha 3$ белка eP2, наоборот, гидрофильна. Обе спирали $\alpha 3$ белков eP1 и eP2 не участвуют в процессе димеризации. Ассиметричность гетеродимера eP1/P2 предполагает, что гетеродимеры eP1/P2 в пентамерном комплексе располагаются в последовательности eP2–eP1 : eP1–eP2 [66].

В архейных рибосомах белки aL10 и aP1 присутствуют в виде комплекса aL10–aP1 в соотношении 1 : 4 или 1 : 6, как было показано с помощью масс-спектрометрии [36, 59]. Рибосомы гипертермофильных архей содержат только гептамерный комплекс aL10•(aP1)₆, тогда как в мезофильных археях было обнаружено две популяции рибосом, которые содержали либо пентамерный, либо гептамерный комплекс aL10–aP1. Соотношение рибосом с пентамерным и гептамерным комплексом изменяется в процессе жизненного цикла клеток. На начальной стадии роста клеток рибосомы содержат преимущественно пентамерный комплекс aL10•(aP1)₄. При переходе клеток в стационарную фазу роста изменяется соотношение белков aL10 и aP1, и преобладают рибосомы с гептамерным комплексом aL10•(aP1)₆ [36].

Архейные рибосомы, содержащие тримерный комплекс aL10•(aP1)₂, имеют активность гидролиза ГТФ и синтеза полифенилаланина на уровне 55% от активности рибосом с гептамерным комплексом. Активность рибосом с пентамерным комплексом составляет около 95%. Таким образом, пентамерный и гептамерный комплексы aL10–aP1 не сильно отличаются по доступности для факторов трансляции. Возможно, третий димер архейного белка aP1 необходим для полноценного функционирования архейной рибосомы при температуре близкой к оптимальной температуре роста (например, для *P. horicoshii* составляет 95°C) [59].

Рибосомные белки a/eL10

Эукариотический белок eL10 содержит два структурных элемента, с которыми связываются два eP1-eP2 гетеродимера [75]. С помощью удаления С-концевых аминокислотных остатков было показано, что первый сайт связывания гетеродимера eP1-eP2 расположен в районе 205–230 а. о., а второй сайт – 240–255 а. о. (нумерация по *Bombux mori*) [75, 76].

Архейный и эукариотический рибосомные белки a/eL10 подобно бактериальному белку bL10 являются посредниками между архейным aP1, эукариотическим eP1/P2 и рибосомой. Архейный и эукариотический белки a/eL10 состоят из трех доменов (рис. 3). Консервативный среди всех доменов жизни N-концевой домен 1 белка a/eL10 является РНК-связывающим доменом, который ответственен за прикрепление рибосомного комплекса aL10–aP1 или eL10–eP1/P2 к большой субчастице рибосомы. Второй (специфичный домен) обнаружен только в составе белков a/eL10 архей и эукариот и отсутствует в бактериальном аналоге [77, 78]. С-концевой спиральный домен служит местом посадки для двух гетеродимеров eP1–eP2 в случае эукариотического Р-выступа и двух или трех гомодимеров aP1 в случае архейного Р-выступа.

В 2010 году были определены кристаллические структуры архейного рибосомного комплекса белка aL10 с димерами N-концевого домена белка aP1 из *P. horicoshii* (разрешение 2.1 Å) [67] и двухдоменного N-концевого фрагмента архейного рибосомного белка aL10 (aL10NTF) из *Methanococcus jannaschii* (разрешение 1.6 Å) [77].

N-концевой домен 1 архейного белка aL10 состоит из двух частей, которые соответствуют аминокислотным остаткам 1–111 и 192–206 (нумерация по *M. jannaschii*) [67, 77]. Второй домен белка aL10 является вставкой в первый и содержит аминокислотные остатки 115–188. Оба домена соединены перетяжкой, которая состоит из двух противоположно направленных β-тяжей. Домен 2 может смещаться относительно домена 1 на 13 Å [77]. С-концевой домен белка aL10 в два раза длиннее (рис. 3) бактериального bL10CTD и отличается от него по структуре. Он содержит три независимые α-спирали, соединенные короткой перетяжкой из 6 а. о. С каждой спиралью С-концевого домена белка aL10 связывается один димер белка aP1 [67].

Пространственная структура изолированного эукариотического белка eL10 не определена. На основании высокой гомологии архейного и эукариотического белков a/eL10 и кристаллической структуры архейного белка aL10 в комплексе с димерами N-концевых доменов

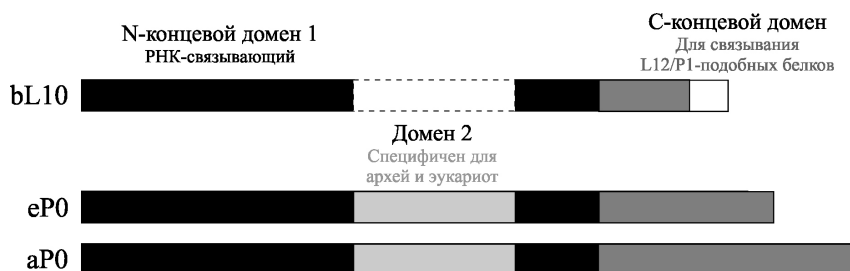


Рис. 3. Схема последовательностей полипептидных цепей рибосомных белков uL10.

Черным цветом окрашен N-концевой домен 1, светло-серым – домен 2, серым – C-концевой домен. Белым прямоугольником со сплошной линией обозначена дополнительная аминокислотная последовательность термофильных бактериальных белков bL10.

белка aP1 была предсказана модель структуры эукариотического белка eL10 в комплексе с N-концевыми доменами гетеродимера eP1–eP2 [79]. В данной модели была предсказана структура только N-концевого домена 1 и C-концевого домена белка eL10, поэтому определение структуры его домена 2 до сих пор остается актуальным.

Участок архейного и эукариотического белков a/eL10, соответствующий домену 2, обеспечивает специфичность взаимодействия рибосомы с эукариотическими или архейными факторами трансляции, но не с бактериальными. Удаление этого домена приводит к снижению до 40% фактор-зависимого гидролиза ГТФ и уровня синтеза полифенилаланина гибридными рибосомами *E. coli* с эукариотическими и архейными факторами трансляции [67].

N-концевой домен 1 архейного белка aL10 взаимодействует со спиралью H42 домена II 23S рРНК подобно связыванию бактериального белка bL10 с 23S рРНК, причем основной контакт между архейным белком aL10 и рРНК также приходится на сахаро-фосфатный остов РНК (мотив «излом–поворот») [34].

Первые 20 аминокислотных остатков эукариотического белка eL10 необходимы для связывания с 26/28S рРНК [76]. Между 40 и 70 а. о. располагается аргинин-богатый участок, который обеспечивает дополнительный контакт с рРНК [80]. В комплексе с белками eP1/P2 повышается сродство белка eL10 к рРНК [81]. Наиболее вероятно, что eP1/P2 выполняют дополнительную функцию модулятора при связывании белка eL10 с рибосомой.

Рибосомные белки a/eL11

Эукариотический рибосомный белок eL11 является функциональным аналогом архейного и бактериального белков a/bL11. С помощью химического сшивания соседних молекул показано, что эукариотический белок eL11 взаимодействует с эукариотическими факторами элонгации eEF1 α и eEF2 [82]. Белок eL11 связывается с 26/28S рРНК в участке, эквивалентном участку связывания архейного/бактериального белков a/bL11 на 23S рРНК.

Стоит заметить, что на данный момент пространственная структура изолированного эукариотического белка eL11 не определена. Известна только модель eL11 в составе дрожжевой рибосомы в виде полиаланиновой цепи [83].

Архейный белок aL11 гомологичен бактериальному белку bL11 [65]. В настоящее время пространственная структура архейного белка aL11 частично визуализирована только в составе 50S субчастицы рибосомы из *H. marismortui* [84]. Белок aL11 состоит из двух доменов, соединенных короткой перетяжкой. Из-за плохого качества электронной плотности в районе N-концевого домена детали структуры этого домена плохо различимы [84].

Архейный aL11 посредством С-концевого домена связывается со спиралями H43–44 домена II 23S рРНК. Сайты связывания архейных aL10 и aL11 расположены на рРНК рядом. Важно отметить, что архейный белок aL11 стимулирует связывание архейного aL10 с рРНК только при высоких температурах (70°C), тогда как при низких температурах (37°C) стимулирования не наблюдается [85]. РНК-связывающая поверхность белка aL11 образована спиралью $\alpha 5$ и петлями $\alpha 3$ - $\alpha 4$ и $\alpha 4$ - $\alpha 5$, которые расположены по бокам спирали $\alpha 5$. Спираль $\alpha 5$ С-концевого домена образует протяженную сеть взаимодействий с 23S рРНК, располагаясь вдоль малого желобка рРНК [84].

N-концевой домен архейного aL11 способствует доставке факторов элонгации и терминации трансляции в ГТФаза-связывающий центр архейной рибосомы. Было показано, что архейная рибосома восприимчива к пептидным антибиотикам тиострептон и микрококцину. Наиболее вероятно, что архейный белок aL11 может быть мишенью для данного класса антибиотиков [86].

IV. ВЗАИМОЗАМЕНЯЕМОСТЬ БОКОВОГО ВЫСТУПА БАКТЕРИЙ, АРХЕЙ И ЭУКАРИОТ

После того, как было показано, что L12/P-выступ является функционально важным морфологическим элементом рибосом бактерий, архей и эукариот, были предприняты первые попытки создать гибридную рибосому в условиях *in vitro*. В 1981 году была впервые реконструирована первая эукариотическая гибридная рибосома. После удаления белков eL10, eL11 и eP1/P2 с эукариотической рибосомы экстракцией смесью NH_4Cl /этанол к «вакантной» рибосоме были добавлены соответствующие бактериальные белки. Однако полученная гибридная рибосома оказалась неактивна [87]. Также белковый комплекс aL10–aP1 архейной рибосомы был заменен на бактериальный комплекс bL10–bL12, и, наоборот, комплекс bL10–bL12 бактериальной рибосомы на архейный комплекс aL10–aP1. С помощью электронной микроскопии было продемонстрировано наличие L12/P-выступа в гибридных рибосомах, который образован bL10–bL12 или aL10–aP1 комплексами, но функциональная активность таких рибосом не проверялась [88].

Впервые активную гибридную бактериальную рибосому из *E. coli* с эукариотическим P-выступом рибосомы крысы удалось получить в лаборатории Nachimori [89]. Данная замена изменяет специфичность связывания бактериального EF2 на связывание эукариотического eEF2 и стимулирует ГТФазную активность последнего. Уровень гидролиза ГТФ на eEF2 в гибридной рибосоме сопоставим с уровнем гидролиза ГТФ на eEF2 в эукариотической 80S рибосоме [68]. При этом активность гибридной рибосомы при синтезе полифенилаланина в присутствии эукариотических факторов элонгации eEF1 α и eEF2 находится на том же уровне, как для эукариотической рибосомы [68, 76].

Архейные белки P-выступа, как и их эукариотические гомологи, способны замещать бактериальные белки L12-выступа [68]. Такая замена приводит к тому, что реконструированная гибридная рибосома становится доступной как для архейных факторов элонгации, так и для эукариотических, но не для бактериальных факторов элонгации. Активность гидролиза ГТФ и синтеза полифенилаланина гибридной рибосомы, содержащей архейные белки бокового выступа, в присутствии эукариотических факторов элонгации сопоставима с таковыми для гибридной рибосомы, в которой бактериальный L12-выступ заменен на эукариотический аналог. Стоит отметить, что синтез полифенилаланина и ГТФазная активность гибридной

рибосомы с архейным Р-выступом одинаковы с эукариотическими и архейными факторами элонгации [68].

Белки L12-выступа митохондрий человека имеют высокую степень гомологии с соответствующими бактериальными белками. L12-выступ митохондрий способен заменить аналогичный выступ на рибосоме *E. coli* с образованием функционально активной гибридной рибосомы [90]. Получившаяся гибридная рибосома с митохондриальным L12-выступом имеет высокую активность синтеза полифенилаланина в присутствии бактериальных или митохондриальных факторов элонгации.

Таким образом, с помощью этих экспериментов была продемонстрирована ключевая роль белков L12/Р-выступа в специфическом узнавании трансляционных факторов. uL10–L12-подобный комплекс, но не белки uL11, ответственен за специфичность взаимодействия между рибосомой и факторами трансляции. Важно отметить, что изменение в специфичном узнавании факторов элонгации, вызванное замещением белков бокового выступа на их гомологи (или аналоги) на рибосоме, сопровождается изменениями в структуре участков 23S/28S рРНК в области сарцин-рициновой петли и спиралей H43–44 [91].

V. КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ L12/Р-ВЫСТУПА В СОСТАВЕ РИБОСОМ

Использование рентгеноструктурного анализа открыло возможность определения не только важных морфологических деталей рибосомы, но и внутренней структуры рибосомы, третичных структур рибосомных РНК в составе рибосомы, расположения и структур рибосомных белков. Первые кристаллы рибосом, пригодные для рентгеноструктурного анализа, были получены еще в конце 1980-х годов. Но только в 2000 году была впервые определена кристаллическая структура 50S субчастицы рибосомы из археи *H. marismortui* с высоким разрешением [38]. Эта структура содержала 2711 из 2923 нуклеотидных остатков 23S рРНК, полностью 5S рРНК и структуры для 27 из 31 рибосомных белков. Электронная плотность для белков aL1, aL10, aL11 и aP1 отсутствовала, хотя ранее они были локализованы в составе этой рибосомной субчастицы с помощью электронной микроскопии и дифракционных данных низкого разрешения [92].

В 2009 году в составе 70S бактериальной рибосомы в комплексе с EF2 из *T. thermophilus* была определена структура L12-выступа [93]. Фактор элонгации EF2 напрямую взаимодействует с bL11 и C-концевым доменом bL12. Из-за низкого качества электронной

плотности в районе бокового выступа структура белкового комплекса bL10-bL12 была определена в виде полиаланиновой цепи. Спираль $\alpha 8$ белка bL10 изгибается по сравнению с ее положением в структуре изолированного комплекса bL10-bL12NTD, позволяя С-концевому домену bL12CTD взаимодействовать и с N-концевым доменом bL11, и с G'-доменом EF2. В свою очередь, N-концевой домен bL11 вместе с нуклеотидными остатками 1067 и 1095 23S рРНК взаимодействует с доменом V фактора элонгации EF2 [93].

В составе 80S эукариотической рибосомы из *S. cerevisiae* Р-выступ был частично визуализирован [83]. Белки этого выступа удалось вписать в карту электронной плотности только в виде полиаланиновых цепей. Исключение составил консервативный N-концевой РНК-связывающий домен 1 белка eL10, структура которого была определена полностью. Общая укладка eL10NTD совпадает с укладками N-концевых доменов бактериального bL10 и архейного aL10.

Наиболее полную структуру архейного Р-выступа удалось определить при переуточнении структуры 50S субчастицы рибосомы из археи *H. marismortui* в 2013 году [84]. В результате переуточнения был визуализирован не только Р-выступ, но и некоторые рибосомные компоненты, структура которых не была известна (например, специфический для архей белок LX). Уточнение структуры большой субчастицы позволило интерпретировать электронную плотность для приблизительно 2/3 белка aL10 (С-концевой домен в виде полиаланиновой цепи) и одного димера N-концевого домена aP1 (как полиаланиновая цепь), а также дополнить структуру белка aL11.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Боковой L12/P-выступ играет ключевую роль во взаимодействии рибосомы с факторами трансляции. Структурная организация этого выступа подобна среди доменов жизни, несмотря на то, что входящие в его состав рибосомные белки отличаются: белки бактериального L12-выступа имеют низкую гомологию и по последовательности и по структуре с соответствующими белками, формирующими Р-выступ в археях и эукариотах.

За последнее десятилетие произошел огромный прорыв в определении пространственных структур рибосомы и изолированных белков данного бокового выступа, но до сих пор остаются пробелы в понимании взаимодействия этих белков между собой и с высокомолекулярной рРНК. В данном обзоре рассматриваются работы последних лет, посвященные данной теме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lake, J.A. (1976) Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **105**, 131–159.
2. Boublik, M., Hellmann, W., Roth, H.E. (1976) Localization of ribosomal proteins L7/L12 in the 50S subunit of *Escherichia coli* ribosomes by electron microscopy, *J. Mol. Biol.*, **107**, 479–490.
3. Спириин А.С. (2011) *Молекулярная биология: рибосомы и биосинтез белка*, Москва: Академия, 496 с.
4. Huang, C., Mandava, C.S., Sanyal, S. (2010) The ribosomal stalk plays a key role in IF2-mediated association of the ribosomal subunits, *J. Mol. Biol.*, **399**, 145–153
5. Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. (1970) Ribosomal proteins, XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 1276–1282.
6. Liao, D., Dennis, P.P. (1994) Molecular phylogenies based on ribosomal protein L11, L1, L10, and L12 sequences, *J. Mol. Evol.*, **38**, 405–419.
7. Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H.D., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L.J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., McAlear, M., Moore, P.B., Noller, H.F., Ortega, J., Panse, V.G., Ramakrishnan, V., Spahn, C.M.T., Steitz, T., Tchorzewski, M., Tollervey, D., Warren, A.J., Williamson, J.R., Wilson, D., Yonath, A., Yusupov, M. (2014) A new system for naming ribosomal proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **24**, 165–169.
8. Highland J.H., Howard, G.A. (1975) Assembly of ribosomal proteins L7, L10, L11, and L12 on the 50S subunit of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 831–834.
9. Hardy, S.J.S. (1975) The stoichiometry of the ribosomal proteins of *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, **140**, 253–274.
10. Terhorst, C., Möller, W., Laursen, R., Wittmann-Liebold, B. (1972) Amino acid sequence of a 50S ribosomal protein involved in both EF-G and EF-T dependent GTP-hydrolysis, *FEBS Lett.*, **28**, 325–328.
11. Ramagopal S., Subramanian, A.R. (1974) Alteration in the acetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2136–2140.
12. Gordiyenko, Y., Deroo, S., Zhou, M., Videler, H., Robinson, C.V. (2008) Acetylation of L12 increases interactions in the *Escherichia coli* ribosomal stalk complex, *J. Mol. Biol.*, **380**, 404–414.
13. Pettersson, I., Kurland, C.G. (1980) Ribosomal protein L7/L12 is required for optimal translation, *Biochemistry*, **77**, 4007–4010.
14. Kirsebom, L.A., Isaksson, L.A. (1985) Involvement of ribosomal protein L7/L12 in control of translational accuracy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 717–721.
15. Sander, G., Marsh, R.C., Voigt, J., Parmeggiani, A. (1975) A comparative study of the 50S ribosomal subunit and several 50S subparticles in EF-T and EF-G-dependent activities, *Biochemistry*, **14**, 1805–1814.
16. Koteliansky, V.E., Domogatsky, S.P., Gudkov, A.T. (1978) Dimer state of protein L7/L12 and EF-G-dependent reactions on ribosomes, *FEBS J.*, **90**, 319–323.
17. Donner, D., Villems, R., Liljas, A., Kurland, C.G. (1978) Guanosinetriphosphatase activity dependent on

- elongation factor Tu and ribosomal protein L7/L12, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3192–3195.
18. Brot, N., Weissbach, H. (1981) Chemistry and biology of *E. coli* ribosomal protein L12, *Mol. Cell. Biochem.*, **63**, 47–63.
 19. Wong, K.-P., Paradies, H.H. (1974) Shape properties of proteins L7 and L12 from *E. coli* ribosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 178–184.
 20. Kar, E.G., Aune, K.C. (1981) Solution behavior of proteins L7/L12 from the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **20**, 4638–4646.
 21. Gudkov, A.T., Behlke, J. (1978) The N-terminal sequence protein of L7/L12 is responsible for its dimerization, *FEBS J.*, **90**, 309–312.
 22. Gudkov, A.T., Tumanova, L.G., Gongadze, G.M., Bushuev, V.N. (1980) Role of different regions of ribosomal proteins L7 and L10 in their complex formation and in the interaction with the ribosomal 50S subunit, *FEBS Lett.*, **109**, 34–38.
 23. Gudkov, A.T., Gongadze, G.M., Bushuev, V.N., Okon, M.S. (1982) Proton nuclear magnetic resonance study of the ribosomal protein L7/L12 *in situ*, *FEBS Lett.*, **138**, 229–232.
 24. Olson, H.M., Tewari, D.S., Traut, R.R., Glitz, D.G. (1986) Localization of two epitopes of protein L7/L12 to both the body and stalk of the large ribosomal subunit, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6924–6932.
 25. Oleinikov, A.V., Jokhadze, G.G., Traut, R.R. (1998) A single-headed dimer of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12 supports protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4215–4218.
 26. Bocharov, E.V., Sobol, A.G., Pavlov, K.V., Korzhnev, D.M., Jaravine, V.A., Gudkov, A.T., Arseniev, A.S. (2004) From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome, *J. Biol. Chem.*, **279**, 17697–17706.
 27. Dey, D., Oleinikov, D., Dey, A.V., Traut, R.R. (1995) The hinge region of *Escherichia coli* ribosomal protein L7/L12 is required for factor binding and GTP hydrolysis, *Biochimie*, **77**, 925–930.
 28. Bubunencko, M.G., Chuikov, S.V., Gudkov, A.T. (1992) The length of the interdomain region of the L7/L12 protein is important for its function, *FEBS J.*, **313**, 232–234.
 29. Leijonmarck, M., Eriksson, S., Liljas, A. (1980) Crystal structure of a ribosomal component at 2.6 Å resolution, *Nature*, **286**, 824–826.
 30. Wahl, M.C., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R. (2000) Flexibility, conformational diversity and two dimerization modes in complexes of ribosomal protein L12., *EMBO J.*, **19**, 174–186.
 31. Gudkov, A.T., Tumanova, L.G., Vennyaminov, S.Y., Khechinashvili, N.N. (1978) Stoichiometry and properties of the complex between ribosomal proteins L7 and L10 in solution, *FEBS Lett.*, **93**, 215–218.
 32. Pettersson, I., Hardy, S.J.S., Liljas, A. (1976) The ribosomal protein L8 is a complex of L7/L12 and L10, *FEBS Lett.*, **64**, 135–138.
 33. Pettersson, I., Liljas, A. (1979) The stoichiometry and reconstruction of a stable protein complex from *Escherichia coli* ribosomes, *FEBS Lett.*, **98**, 139–144.
 34. Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J.M., Tonevitsky, A.G., Stark, H., Rodnina, M.V., Wahl, M.C. (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation, *Cell*, **121**, 991–1004.

35. Ilag, L.L., Videler, H., McKay, A.R., Sobott, F., Fucini, P., Nierhaus, K.H., Robinson, C.V. (2005) Heptameric (L12)₆/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8192–8197.
36. Gordiyenko, Y., Videler, H., Zhou, M., McKay, A.R., Fucini, P., Biegel, E., Müller, V., Robinson, C.V. (2010) Mass spectrometry defines the stoichiometry of ribosomal stalk complexes across the phylogenetic tree, *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 1774–83.
37. Rosendahl, G., Douthwaite, S. (1993) Ribosomal proteins L11 and L10. (L12)₄ and the antibiotic thiostrepton interact with overlapping regions of the 23S rRNA backbone in the ribosomal GTPase centre, *J. Mol. Biol.*, **234**, 1013–1020.
38. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science*, **289**, 905–920.
39. Climie, S.C., Friesen, J.D. (1987) Feedback regulation of the *rplJL-rpoBC* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure, *J. Mol. Biol.*, **198**, 371–381.
40. Johnsen, M., Christensen, T., Dennis, P.P., Fiil, N.P. (1982) Autogenous control: ribosomal protein L10-L12 complex binds to the leader sequence of its mRNA, *EMBO J.*, **1**, 999–1004.
41. Harms, J., Schlunzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium, *Cell*, **107**, 679–688.
42. Klein, D.J., Schmeing, T.M., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2001) The kink-turn: A new RNA secondary structure motif, *EMBO J.*, **20**, 4214–4221.
43. Iben, J.R., Draper, D.E. (2008) Specific interactions of the L10-(L12)₄ ribosomal protein complex with mRNA, rRNA, and L11, *Biochemistry*, **10**, 2721–2731.
44. Dijk, J., Garrett, R. A., Muller, R. (1979) Studies on the binding of the ribosomal protein complex L7/12-L10 and protein L11 to the 5'-one third of 23S RNA: a functional centre of the 50S subunit, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2717–2729.
45. Stark, M.J.R., Cundliffe, E., Dijk, J., Stoeffler, G. (1980) Functional homology between *E. coli* ribosomal protein L11 and *B. megaterium* protein BM-L11, *Mol. Gen. Genet.*, **15**, 11–15.
46. Tate, W.P., Dognin, M.J., Noah, M., Stöffler-Meilicke, M., Stöffler, G. (1984) The NH₂-terminal domain of *Escherichia coli* ribosomal protein L11, *J. Biol. Chem.*, **259**, 7317–7324.
47. Schrier, P.I., Möller, W. (1975) The involvement of 50S ribosomal protein L11 in the EF-G dependent GTP hydrolysis of *E. coli* ribosomes, *FEBS Lett.*, **54**, 130–134.
48. Kazemie, M. (1976) Binding of aminoacyl-tRNA to reconstituted subparticles of *Escherichia coli* large ribosomal subunits, *Eur. J. Biochem.*, **67**, 373–378.
49. Ilin, S., Hoskins, A., Ohlenschläger, O., Jonker, H.R.A., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2005) Domain reorientation and induced fit upon RNA binding: solution structure and dynamics of ribosomal protein L11 from *Thermotoga maritima*, *ChemBioChem*, **6**, 1611–1618.
50. Wimberly, B.T., Guymon, R., McCutcheon, J.P., White, S.W., Ramakrishnan, V. (1999) A detailed view of a ribosomal active site: The structure

- of the L11–RNA complex, *Cell*, **97**, 491–502.
51. Harms, J.M., Wilson, D.N., Schlutzenzen, F., Connell, S.R., Stachelhaus, T., Zaborowska, Z., Spahn, C.M.T., Fucini, P. (2008) Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococcin, *Mol. Cell*, **30**, 26–38.
52. Bausch, S.L., Poliakova, E., Draper, D.E. (2005) Interactions of the N-terminal domain of ribosomal protein L11 with thiostrepton and rRNA, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29956–29963.
53. Xing, Y., Draper, D.E. (1996) Cooperative interactions of RNA and thiostrepton antibiotic with two domains of ribosomal protein L11, *Biochemistry*, **35**, 1581–1588.
54. Thompson, J., Cundliffe, E., Stark, M. (1979) Binding of thiostrepton to a complex of 23S rRNA with ribosomal protein L11, *FEBS J.*, **98**, 261–265.
55. Cundliffe, E., Dixon, P., Stark, M., Stöffler, G., Ehrlich, R., Stöffler-Meilicke, M., Cannon, M. (1979) Ribosomes in thiostrepton-resistant mutants of *Bacillus megaterium* lacking a single 50S subunit protein, *J. Mol. Biol.*, **132**, 235–252.
56. Uchiumi, T., Albert, J.W., Traut, R.R. (1987) Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5580–5584.
57. van Agthoven, A., Kriek, J., Amons, R., Möller, W. (1978) Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60S ribosomes from *Artemia salina* and rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **91**, 553–565.
58. Santos, C., Ballesta, J.P. (1994) Ribosomal protein P0, contrary to phosphoproteins P1 and P2, is required for ribosome activity and *Saccharomyces cerevisiae* viability, *J. Biol. Chem.*, **269**, 15689–15696.
59. Maki, Y., Hashimoto, T., Zhou, M., Naganuma, T., Ohta, J., Nomura, T., Robinson, C.V., Uchiumi, T. (2007) Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism, *J. Biol. Chem.*, **282**, 32827–32833.
60. Casiano, C., Matheson, A.T., Traut, R.R. (1990) Occurrence in the archaebacterium *Sulfolobus solfataricus* ribosomal protein complex corresponding to *Escherichia coli* (L7/L12)₄-L10 and eukaryotic (P1)₂/(P2)₂-P0, *J. Biol. Chem.*, **265**, 18757–18761.
61. Szick, K., Springer, M., Bailey-Serres, J. (1998) Evolutionary analyses of the 12-kDa acidic ribosomal P-proteins reveal a distinct protein of higher plant ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2378–2383.
62. Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K., Lee, C.-H.K. (1997) Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots, *Plant Physiol.*, **114**, 1293–1305.
63. Tchórzewski, M., Boldyreff, B., Issinger, O. G., Grankowski, N. (2000) Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: Evaluation by the two hybrid system, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**, 737–746.
64. Nusspaumer, G., Remacha, M., Ballesta, J. P. (2000) Phosphorylation and N-terminal region of yeast ribosomal protein P1 mediate its degradation, which is prevented by protein P2. *EMBO J.*, **19**, 6075–6084.
65. Casiano, C., Traut, R.R. (1991) Protein topography of *Sulfolobus solfataricus* ribosomes by cross-linking with 2-iminothiolane, *J. Biol. Chem.*, **266**, 21578–21583.

66. Lee, K.-M., Yu, C.W.-H., Chiu, T.Y.-H., Sze, K.-H., Shaw, P.-C., Wong, K.-B. (2012) Solution structure of the dimerization domain of the eukaryotic stalk P1/P2 complex reveals the structural organization of eukaryotic stalk complex, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3172–3182.
67. Naganuma, T., Nomura, N., Yao, M., Mochizuki, M., Uchiumi, T., Tanaka, I. (2010) Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **285**, 4747–56.
68. Nomura, T., Nakano, K., Maki, Y., Naganuma, T., Nakashima, T., Tanaka, I., Kimura, M., Hachimori, A., Uchiumi, T. (2006) *In vitro* reconstitution of the GTPase-associated centre of the archaeobacterial ribosome: the functional features observed in a hybrid form with *Escherichia coli* 50S subunits, *Biochem. J.*, **396**, 565–571.
69. Nomura, N., Honda, T., Baba, K., Naganuma, T., Tanzawa, T., Arisaka, F., Noda, M., Uchiyama, S., Tanaka, I., Yao, M., Uchiumi, T. (2012) Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 3748–3753.
70. Naganuma, T., Shiogama, K., Uchiumi, T. (2007) The N-terminal regions of eukaryotic acidic phosphoproteins P1 and P2 are crucial for heterodimerization and assembly into the ribosomal GTPase-associated center, *Genes to cells*, **12**, 501–510.
71. Uchiumi, T., Traut, R.R., Kominami, R. (1990) Monoclonal antibodies against acidic phosphoproteins P0, P1, and P2 of eukaryotic ribosomes as functional probes, *J. Biol. Chem.*, **265**, 89–95.
72. Lee, K.-M., Yusa, K., Chu, L.-O., Yu, C.W.-H., Oono, M., Miyoshi, T., Ito, K., Shaw, P.-C., Wong, K.-B., Uchiumi, T. (2013) Solution structure of human P1•P2 heterodimer provides insights into the role of eukaryotic stalk in recruiting the ribosome-inactivating protein trichosanthin to the ribosome, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8776–8787.
73. Ito, K., Honda, T., Suzuki, T., Miyoshi, T., Murakami, R., Yao, M., Uchiumi, T. (2014) Molecular insights into the interaction of the ribosomal stalk protein with elongation factor 1 α , *Nucleic Acids Res.*, **42**, 14042–14052.
74. Grela, P., Bernadó, P., Svergun, D., Kwiatowski, J., Abramczyk, D., Grankowski, N., Tchórzewski, M. (2008) Structural relationships among the ribosomal stalk proteins from the three domains of life, *J. Mol. Evol.*, **67**, 154–167.
75. Baba, K., Tumoraya, K., Tanaka, I., Yao, M., Uchiumi, T. (2013) Molecular dissection of the silkworm ribosomal stalk complex: the role of multiple copies of the stalk proteins, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3635–3643.
76. Hagiya, A., Naganuma, T., Maki, Y., Ohta, J., Tohkairin, Y., Shimizu, T., Nomura, T., Hachimori, A., Uchiumi, T. (2005) A mode of assembly of P0, P1, and P2 proteins at the GTPase-associated center in animal ribosome: *in vitro* analyses with P0 truncation mutants, *J. Biol. Chem.*, **280**, 39193–39199.
77. Kravchenko, O., Mitroshin, I., Nikonov, S., Piendl, W., Garber, M. (2010) Structure of a two-domain N-terminal fragment of ribosomal protein L10 from *Methanococcus jannaschii* reveals a specific piece of the archaeal ribosomal stalk, *J. Mol. Biol.*, **399**, 214–220.
78. Santos, C., Remacha, M., Ballesta, J.P.G. (2004) Ribosomal P0 protein domain involved in selectivity of

- antifungal sordarin derivatives, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 2930–2936.
79. Choi, A., Wong, E., Lee, K.-M., Wong, K.-B. (2015) Structures of eukaryotic ribosomal stalk proteins and its complex with trichosanthin, and their implications in recruiting ribosome-inactivating proteins to the ribosomes, *Toxins*, **7**, 638–647.
80. Shimizu, T., Nakagaki, M., Nishi, Y., Kobayashi, Y., Hachimori, A., Uchiumi, T. (2002) Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2620–2627.
81. Uchiumi, T., Kominami, R. (1997) Binding of mammalian ribosomal protein complex P0•P1•P2 and protein L12 to the GTPase-associated domain of 28S ribosomal RNA and effect on the accessibility to anti-28S RNA autoantibody, *J. Biol. Chem.*, **272**, 3302–3308.
82. Uchiumi, T., Kikuchi, M., Terao, K., Iwasaki, K., Ogata, K. (1986) Cross-linking of elongation factor 2 to rat-liver ribosomal proteins by 2-iminothiolane, *Eur. J. Biochem.*, **156**, 37–48.
83. Ben-Shem, A., de Loubresse, S., Melnikov, N.G., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution, *Science*, **334**, 1524–1529.
84. Gabdulkhakov, A., Nikonov, S., Garber, M. (2013) Revisiting the *Haloarcula marismortui* 50S ribosomal subunit model, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 997–1004.
85. Shcherbakov, D., Dontsova, M., Tribus, M., Garber, M., Piendl, W. (2006) Stability of the ‘L12 stalk’ in ribosomes from mesophilic and (hyper)thermophilic Archaea and Bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5800–5814.
86. Beauclerk, A.A.D., Hummel, H., Holmes, D.J., Bock, A., Cundliffe, E. (1985) Studies of the GTPase domain of archaeobacterial ribosomes, *FEBS J.*, **151**, 245–255.
87. Sanchez-Madrid, F., Vidales, F.J., Ballesta, J.P.G. (1981) Functional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacterial and eukaryotic cells, *Biochemistry*, **20**, 3263–3266.
88. Stöffler-Meilicke, M., Stöffler, G. (1991) The binding site of ribosomal protein L10 in Eubacteria and Archaeobacteria is conserved: Reconstitution of chimeric 50S subunits, *Biochimie*, **73**, 797–804.
89. Uchiumi, T., Hori, K., Nomura, T., Hachimori, A. (1999) Replacement of L7/L12.L10 protein complex in *Escherichia coli* ribosomes with the eukaryotic counterpart changes the specificity of elongation factor binding, *J. Biol. Chem.*, **274**, 27578–27582.
90. Han, M.-J., Cimen, H., Miller-Lee, J.L., Koc, H., Koc, E.C. (2011) Purification of human mitochondrial ribosomal L7/L12 stalk proteins and reconstitution of functional hybrid ribosomes in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, **78**, 48–54.
91. Uchiumi, T., Honma, S., Endo, Y., Hachimori, A. (2002) Ribosomal proteins at the stalk region modulate functional rRNA structures in the GTPase center, *J. Biol. Chem.*, **277**, 41401–41409.
92. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B., Steitz, T.A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit, *Nature*, **400**, 841–847.

93. Gao, Y.-G., Selmer, M., Dunham, C.M., Weixlbaumer, A., Kelley, A.C., Ramakrishnan, V. (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the post-translocational state, *Science*, **326**, 694–699.