

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ С РИБОСОМНЫМИ РНК

© 2002 г.

А. Д. НИКУЛИН

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Современные представления о структуре рибосомы и рибосомных субчастиц. III. Взаимодействия в рРНК-белковых комплексах. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизма биосинтеза белка неразрывно связано с изучением структуры рибосомы. За 40 лет накоплен огромный экспериментальный материал, касающийся структуры и функции рибосомы, однако долгое время в распоряжении исследователей не было достаточно точных данных по структуре рибосомы. В последние 5 лет с помощью криоэлектронной микроскопии было получено детальное описание формы и архитектуры рибосомы [33, 82, 95], однако наиболее точные модели структуры рибосомы оказалось возможным получить только применяя рентгеноструктурные методы исследования.

Рентгеноструктурные исследования в первую очередь зависят от получения совершенных кристаллов, дающих дифракционную картину рассеивания рентгеновских лучей с высоким разрешением. Первые кристаллы рибосомных субчастиц и целых рибосом были получены еще на рубеже 80-х годов XX века [1]. В 1987 году были получены кристаллы 70S рибосомы и 30S рибосомной субчастицы *Thermus thermophilus*, пригодные для рентгеноструктурного анализа [89]. Однако, только недавно были получены карты электронной плотности большой субчастицы из *Haloarcula marismortui* с разрешением 2,4 Å [62], малой субчастицы из *T. thermophilus* с разрешением 3,04 Å [102] и 3,3 Å [76], а также целой 70S рибосомы из *T. thermophilus* с разрешением 5,5 Å [113]. Эти результаты являются выдающимся

Адрес для корреспонденции: e-mail: Nikulin@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 01-04-48343) и Медицинского Института Ховарда Хьюза (грант #55000308).

достижением современной рентгеновской кристаллографии и они открывают совершенно новую эпоху в изучении строения и функции рибосомы. Полученные карты электронной плотности позволили определить пространственную структуру рРНК, относительное расположение, форму и вторичную структуру большинства рибосомных белков, а также проанализировать и соотнести накопленные биохимические данные со структурными данными. В настоящее время модели рибосомных субчастиц активно используются для определения положения антибиотиков на рибосоме и предсказания их контактов с рРНК [17, 18, 73].

Тем не менее, полученные модели рибосомы и рибосомных субчастиц содержат довольно большую ошибку в координатах атомов, что не позволяет с достаточной точностью проанализировать взаимодействия рибосомных белков и рРНК между собой. Кроме того, структуру не всех участков рибосомы удается определить даже при наличии карт электронной плотности высокого разрешения. Поэтому в настоящее время большое внимание уделяется структурным исследованиям сравнительно небольших комплексов рибосомных белков со специфично связывающимися фрагментами рРНК. Для таких комплексов можно получить кристаллы, дающие дифракционные картины высокого разрешения, определить структуры комплексов с высокой точностью и детально проанализировать РНК-белковые взаимодействия. Структуры белков и фрагментов рРНК в составе бинарных комплексов не отличаются от таковых в составе рибосомы, что было успешно подтверждено сравнением полученных к настоящему времени структур рРНК-белковых комплексов с моделями рибосомных субчастиц. Таким образом, определение структур рРНК-белковых комплексов позволяет восполнять пробелы в структуре рибосомы.

II. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ РИБОСОМЫ И РИБОСОМНЫХ СУБЧАСТИЦ

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РИБОСОМЫ

Рибосома представляет собой сложную асимметричную рибонуклеопротеидную частицу, состоящую из нескольких рибосомных РНК (рРНК) и около 50 рибосомных белков. Рибосомы из разных организмов внешне очень похожи: все они состоят из большой и малой рибосомных субчастиц, которые при определенных условиях легко разделяются. В бактериальных рибосомах это 30S (малая) и 50S (большая) рибосомные субчастицы, которые при ассоциации образуют 70S рибосому.

Первоначальные данные о морфологии рибосомы были получены электронно-микроскопическими (ЭМ) исследованиями с использованием методов негативного контрастирования или оттенения металлом. Полученные модели 30S [94] и 50S субчастиц [46, 96] достаточно хорошо описывали их морфологию. Дальнейшее развитие техники электронной микроскопии позволило повысить разрешение и получить более точную информацию о морфологии рибосомы [48, 74].

В середине 1990-х годов для изучения рибосом применили метод электронной микроскопии с использованием трехмерной реконструкции изображений замороженных рибосом [31]. Используя этот метод, две независимые исследовательские группы получили в 1995 году сходные результаты по структуре рибосомы из *E. coli* с разрешением около 25 Å (рис. 1а и 1б — модель Франка [32], и рис. 1в — модель Старка [82]). Полученные данные не только подтвердили определенные ранее детали строения рибосомы, но и позволили выделить несколько новых морфологических деталей.

В электронно-микроскопических моделях рибосомы с разрешением 25 Å имелась большая полость между субчастицами, названная каньоном. Размер и форма каньона позволяли расположить в нем молекулы тРНК в А, Р и Е участках [8], что хорошо согласовывалось с уже известными данными [108], однако точность модели оказалась недостаточной для определения взаимного расположения этих молекул.

Модель 70S рибосомы имела несколько каналов, один из которых начинался в нижней части межсубъединичного каньона в районе пептидилтрансферазного центра большой рибосомной субчастицы и приводил к двум различным выходам на обратной стороне 50S субчастицы (на рис. 1б обозначены как E1 и E2). По гипотезе, выдвинутой А. Йонат в 1987 г. [110], этот канал может служить путем выхода растущей полипептидной цепи из рибосомы.

В районе головки 30S субчастицы в составе 70S рибосомы была обнаружена бороздка. Было высказано предположение, что бороздка является местом расположения мРНК на рибосоме при трансляции. Позднее с помощью электронной микроскопии была получена модель 30S рибосомной субчастицы с разрешением 23 Å [34], которая подтвердила данные по морфологии малой субчастицы, показала, что бороздка на 30S частице действительно является местом локализации мРНК, и что три главных структурных домена (головка, платформа и тело) обладают независимой подвижностью. Такая подвижность отдельных доменов 30S субчастицы хорошо соответствует данным по структурным изменениям рибосомы при трансляции [6, 7, 58].

Позже были получены модели рибосомы с лучшим разрешением (до 20 Å) в двух состояниях: претранслокационном и посттрансла-

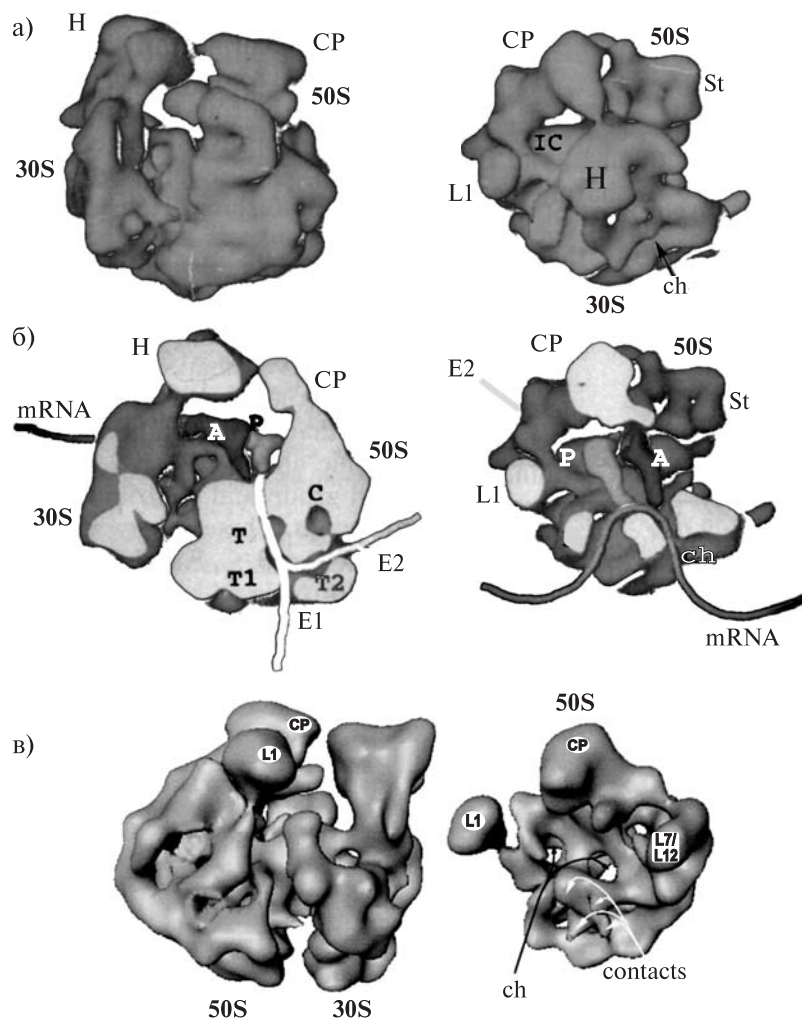


Рис. 1. Электронно-микроскопические модели 70S рибосомы из *E. coli* с разрешением 25 Å.

а). Модель Франка [32]. Слева – вид на модель со стороны L7/L12 протуберанца большой субчастицы, справа – вид со стороны центрального протуберанца большой субчастицы. Обозначены 30S и 50S субчастицы, H – головка малой субчастицы, CP – центральный протуберанец большой субчастицы, St – L7/L12 протуберанец, L1 – L1 протуберанец, IC – межсубчастичный каньон, ch – канал для мРНК в малой субчастице.

б). Предложенная Франком модель работы рибосомы на основе полученных электронно-микроскопических данных [32]. Для удобства показаны сечения

модели рибосомы. Ориентация рибосомы аналогична рис. 1а. Показаны предполагаемые положения молекул тРНК в А и Р участках рибосомы, положение мРНК на рибосоме, ход образующейся полипептидной цепи. Молекулы тРНК расположены таким образом, что антикодоновые петли находятся возле канала для мРНК на 30S субчастице, а аминокислотные концы – в районе пептидилтрансферазного центра 50S субчастицы возле входа в туннель предполагаемого выхода растущей полипептидной цепи. Дополнительно обозначены: Т, Т1, Т2 – предполагаемый туннель для образующейся полипептидной цепи, Е1 и Е2 – предполагаемые выходы полипептидной цепи из рибосомы.

в) Модель Старка [82]. Слева – вид на 70S со стороны белка L1. Справа – 50S субчастица со стороны интерфейса. 50S и 30S – большая и малая рибосомные субчастицы, CP – центральный протуберанец, L1 протуберанец, L7/L12 протуберанец, contacts – места контактов большой субчастицы с малой, ch – каналы в большой субчастице.

локационном [81]. Эти модели подтвердили, что синтез белков действительно может происходить в пространстве между рибосомными субчастицами. Последние электронно-микроскопические модели имеют разрешение 11,5 Å для целой рибосомы [33] и 7,5 Å для большой субчастицы [56], что позволяет идентифицировать отдельные известные участки рРНК и положение ряда белков [38, 51, 59, 61, 70, 79, 92].

В последние годы криоэлектронная микроскопия с успехом использовалась для изучения мест связывания различных молекул с рибосомой. Так, были получены модели 70S рибосомы с fMet-tRNA^{fMet} (разрешение 15 Å) [51], с белком Тет(О) (16 Å) [80], с фактором элонгации EF-G (17 Å) [109], 30S субчастицы с фактором инициации IF-3 (27 Å) [57].

Проводятся также электронно-микроскопические исследования эукариотических рибосом, но полученные модели имеют пока более низкое разрешение. В 1996 году опубликована статья по определению структуры 80S рибосомы из дрожжей с разрешением 38 Å [97]. В работе использовался аналогичный метод трехмерной реконструкции изображений, полученных с помощью криоэлектронной микроскопии. Позднее для рибосомы из дрожжей разрешение было улучшено до 35 Å [34, 98] и 24 Å [60], определены структуры рибосом из печени крысы с разрешением 25 Å [28] и из ретикулоцитов кролика с разрешением 21 Å [27], а также получена структура рибосомы из *Saccharomyces cerevisiae* с фактором EF-2 с разрешением 17,5 Å [37].

По сравнению с прокариотической рибосомой эукариотические рибосомы имеют больший размер, при этом 60S субчастица очень похожа на 50S, а 40S субчастица незначительно отличается по форме от 30S. Архитектура межсубъединичного каньона рибосом не имеет существенных различий и, по-видимому, очень консервативна в процессе эволюции.

ИССЛЕДОВАНИЯ РИБОСОМЫ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫМИ
МЕТОДАМИ

Поиск условий кристаллизации рибосом и рибосомных субчастиц был начат более 20 лет назад — первые кристаллы были получены на рубеже 1980-х годов [1, 2, 89, 106, 111, 112]. В конце 1980-х годов были получены кристаллы, дающие дифракционную картину с достаточно высоким разрешением: 7–12 Å — для 30S субчастицы [110, 115, 114], 9 Å — для 50S субчастицы [99], 18–20 Å — для 70S рибосомы [88, 114] и 15 Å — для 70S в комплексе с олиго-У мРНК и инициаторными тРНК [39, 110]. Несмотря на обнадеживающие результаты, проблема получения фаз для отражений от кристаллов таких сложных и больших макромолекул намного превосходила возможности кристаллографических методов. Только в середине 1990-х годов с появлением и развитием новых типов рентгеновских детекторов, широким использованием мощных синхротронных источников рентгеновских лучей, разработкой криогенных методов в кристаллографии, развитием вычислительной техники и программного обеспечения стало возможным определять структуры таких сложных объектов.

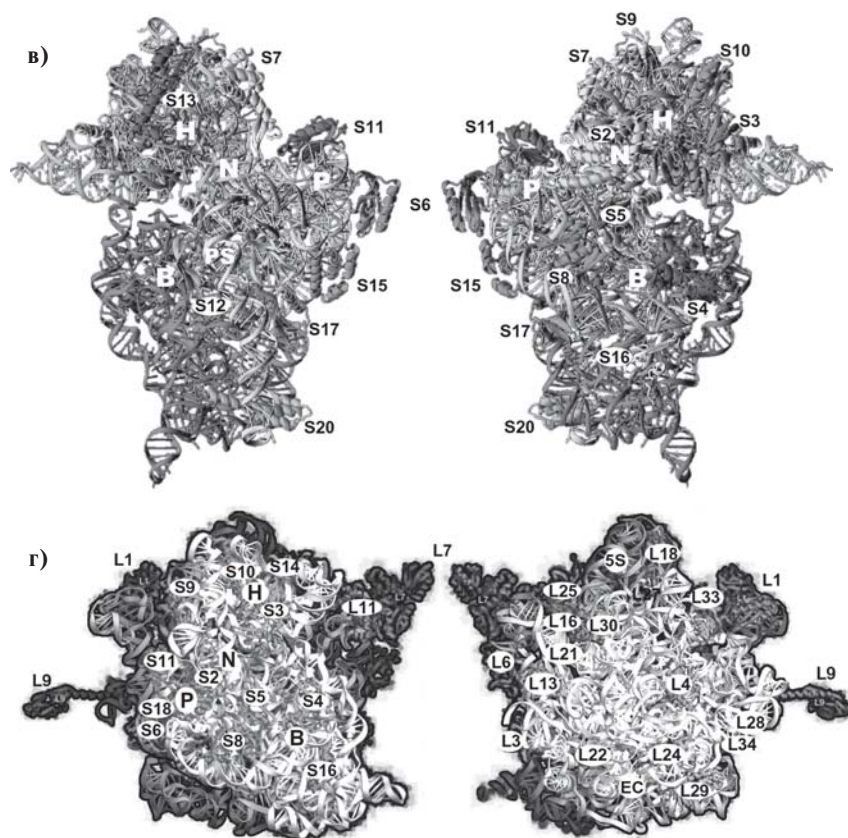
Прорыв в определении структуры рибосом произошел в 1998 году, когда была рассчитана карта электронной плотности 50S субчастицы *H. marismortui* с разрешением 9 Å [10]. Карта была рассчитана с использованием изоморфных производных, но первоначальные фазы были получены на основе 20 Å электронно-микроскопической модели большой рибосомной субчастицы. Полученная электронная плотность имела участки, которые ясно соответствовали двуспиральной А-форме рРНК.

В 1999 году был сделан следующий шаг: получена электронная плотность для 30S субчастицы из *T. thermophilus* с разрешением 5,5 Å [22] и 50S субчастицы из *H. marismortui* с разрешением 5,0 Å [11]. При определении структур субчастиц рибосомы широко использовалось синхротронное излучение и метод многоволнового аномального рассеяния (MAD) с использованием солей лантаноидов, осмия и иридия. Разрешение порядка 5 Å с учетом дополнительной информации по структурам отдельных компонентов рибосомы и биохимических данных оказалось достаточным для определения положения ряда участков двойных спиралей рРНК и рибосомных белков с известными пространственными структурами. Тем не менее, такое разрешение все еще было недостаточно для прямого определения хода цепи как рРНК, так и белков.

Примененный при расчете электронной плотности метод MAD позволяет получить оценку фаз используя только один кристалл в котором имеются атомы тяжелых элементов. Под тяжелыми элемен-

тами подразумеваются элементы тяжелее углерода, кислорода, азота, серы и фосфора. При определенной длине волны рентгеновского излучения для таких атомов заметно поглощение квантов энергии за счет перехода электронов с одних орбиталей на другие. Так, для атомов меди максимальный эффект наблюдается при длине волны 1,380 Å, а для селена — при длине волны 0,979 Å. Величина аномального рассеяния не очень большая, но она увеличивается с ростом номера элемента. Для небольших белков в качестве аномального рассеивателя обычно используют селен, поскольку его очень удобно внедрять в белки выращиванием клеток-суперпродуцентов на минимальной среде с заменой метионина на селенометионин. Для больших и тяжелых макромолекулярных комплексов, особенно для рибосомных субчастиц, селен уже не подходит, поэтому используют соли лантаноидов, урана, металлов платиновой группы, которые имеют большую величину поглощения квантов энергии. Для регистрации небольших по величине эффектов аномального рассеяния требуются очень чувствительные и точные детекторы рассеянных рентгеновских лучей, которые появились только сравнительно недавно. Обязательным условием для проведения MAD-эксперимента является синхротрон, поскольку он позволяет получать необходимую длину волны рентгеновского излучения. Более того, длина волны должна меняться при проведении эксперимента очень плавно и точно, поскольку от этого зависит величина аномального рассеяния. Наконец, важным условием является проведение эксперимента при низкой температуре — порядка 90–100 К. При облучении кристаллов происходит ионизация молекул и возникновение свободных радикалов, что ведет не только к нарушению кристаллической упаковки в кристалле, но и к разрушению молекул. «Замораживание» кристаллов макромолекул резко затормаживает процессы ионизации, что позволяет получать данные по рассеиванию рентгеновских лучей весьма продолжительное время, достаточное для получения нескольких наборов дифракционных данных. Для MAD эксперимента это необходимо, поскольку для определения фаз этим методом требуется, по крайней мере, два набора данных, собранных при разных длинах с одного кристалла, а если сигнал слабый — то три-четыре набора. Таким образом, метод MAD очень мощный и удобный для определения структур макромолекул, но для его проведения имеется ряд достаточно жестких требований, удовлетворить которые оказалось возможным сравнительно недавно.

В 2000 году для 50S субчастицы из *H. marismortui* была получена электронная плотность с разрешением 2,4 Å [12] (рис. 2а и 2б), для 30S субчастиц из *T. thermophilus* — с разрешением 3,0 Å [105] (рис. 2в) и 3,3 Å [77]. Это позволило вписать в плотность до 95% последова-



г). Модель 70S рибосомы *T. thermophilus* с разрешением 5,5 Å [116]. Слева – вид со стороны 30S субчастицы, справа – со стороны 50S субчастицы. На 30S субчастице указаны ее отдельные домены: Н – головка, В – тело, Р – протуберанец, N – шейка. На 50S субчастице указано положение 5S рРНК, L1 протуберанца, L7 протуберанца и выхода из канала в большой рибосомной субчастице (EC). Указано положение некоторых рибосомных белков. Ориентация белка L9 в 50S субчастице является артефактом кристаллографической упаковки молекул рибосомы.

тельности рРНК и определить положение многих рибосомных белков. Белки с известной структурой были вставлены в соответствующие места электронной плотности, для белков с неизвестной структурой проведены видимые участки главной цепи, а также определены положения боковых групп для части аминокислотных остатков. К сожалению, полученные модели имеют координаты далеко не всех атомов, особенно на периферии субчастиц.

Сравнение сахарофосфатного остова 16S рРНК в двух имеющихся моделях 30S субчастицы из *T. thermophilus* показывает, что общая конформация рРНК практически одинакова. Однако при сравнении на атомарном уровне выявляются значительные отличия. Модель В. Рамакришнана [105] состоит из 51737 атомов, в то время как модель А. Йонат [77] состоит всего из 34970 атомов. Это вызвано различием в интерпретации той части электронной плотности, которая соответствует рибосомным белкам с неизвестной структурой. Топология структур таких белков также часто отличается в указанных моделях. Имеются различия и в структуре некоторых районов 16S рРНК, содержащих в общей сложности около 300 нуклеотидов из 1522. В этих областях среднеквадратичное отклонение в координатах фосфатных атомов рРНК составляет 6,2 Å по сравнению с 3,6 Å для всей цепи 16S рРНК. Наиболее точно в моделях описаны те районы 16S рРНК и те рибосомные белки, структура которых в изолированном состоянии была определена ранее.

В 1999 году была получена карта электронной плотности для 70S рибосомы из *T. thermophilus* в комплексе с фрагментом мРНК и тРНК с разрешением 7,8 Å [20]. В следующем году разрешение этой модели 70S рибосомы из *T. thermophilus* было доведено до 5,5 Å [116] (рис. 2г). Наибольший интерес эта модель представляет с точки зрения изучения взаимодействия различных молекул с рибосомой. Так, электронная плотность для тРНК в А-, Р- и Е- сайтах была настолько четкой, что позволила определить их положение на рибосоме с высокой точностью. Более того, было хорошо определено место связывания последовательности Шайна-Дальгарно мРНК с 16S рРНК 30S рибосомной субчастицы.

Интересно отметить, что в рибосоме домены 16S рРНК и 23S рРНК упакованы по-разному. В 30S субчастице каждый домен 16S рРНК формирует отдельный морфологический компонент (рис. 2в): 5'-домен формирует тело (В), центральный домен — платформу (Р), 3'-домен формирует область интерфейса (PS). В противоположность этому шесть структурных доменов 23S рРНК тесно связаны между собой и образуют монолитную структуру (рис. 2б). Такая разница в архитектуре субчастиц, по-видимому, объясняется функциональной необходимостью подвижности частей малой субчастицы при перемещении мРНК в процессе транслкации.

Анализируя полученные модели рибосомы и рибосомных субчастиц можно сделать несколько выводов.

Во-первых, как и было показано ранее [4], рибосомные белки располагаются преимущественно на обращенной к растворителю поверхности рибосомы, а между субчастицами белков практически нет.

Во-вторых, большинство рибосомных белков имеют глобулярную конформацию, однако некоторые содержат вытянутые нерегулярные участки, которые приобретают упорядоченную третичную структуру при связывании с рРНК. Были обнаружены также белки, которые не имеют глобулярной формы, например, белок S14.

В-третьих, главной ролью рибосомных белков, по-видимому, является роль «скрепок», стабилизирующих структуру рРНК. Тем не менее, часть рибосомных белков может играть самостоятельную роль в составе рибосомы.

В-четвертых, вторичная структура рРНК почти полностью состоит из элементов известных ранее для малых фрагментов РНК. Двухнитевые спиральные элементы рРНК соединены петлями, которые часто представляют собой нерегулярные участки А-спиралей РНК, и взаимодействуют между собой малыми желобками (аналогично упаковке интрона I рибозима [19]). Очень часто такие взаимодействия стабилизируются внедрением аденина в малый желобок спирали рРНК, причем эти аденины во многих случаях консервативны [68]. Встречаются и менее распространенные мотивы: взаимодействие фосфатной группы одной спирали с малым желобком второй, а также взаимодействия неспаренных пуринов в двух перпендикулярных спиралях РНК.

III. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В рРНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ

Рибосомные белки, взаимодействующие с рРНК независимо от других белков [69] и связывающиеся только со специфическими участками рРНК [117], называются сердцевинными или первичными РНК-связывающими рибосомными белками. Остальные рибосомные белки также связываются с рРНК, но участки связывания этих белков формируются только после связывания сердцевинных белков [84].

Места связывания белков на молекулах рРНК определяют с использованием разных биохимических, химических и генно-инженерных методов [26], которые позволяют достаточно надежно установить участки последовательностей рРНК, ответственные за специфическое связывание с некоторыми (в основном с сердцевинными) рибосомными белками. Однако места связывания с рРНК на поверхности белковых молекул можно локализовать только приблизительно, поскольку перечисленные методы не дают прямого ответа на вопрос какие аминокислотные остатки участвуют во взаимодействии с рРНК. Определение структур рибосомных субчастиц, рибосомных белков (табл. 1) и ряда рРНК-белковых комплексов (табл. 2) позволяет значительно расширить наши знания о структуре рРНК-белковых интерфейсов и характере рРНК-белковых, рРНК-рРНК и белок-белковых взаимодействий.

Таблица 1.
Структуры рибосомных белков

Белок	Источ-ник*	Разре-шение, Å	Тип	Структурное сходство	Ссыл-ка	Код PDB
L1	<i>Mja</i>	2,3	α/β	РНП домен/Россманин фолд	[64]	1CJS
L1	<i>Tth</i>	1,85	α/β	РНП домен/Россманин фолд	[66, 91]	1AD2
L2	<i>Bst</i>	2,3	β	OB fold/SN3 β -цилиндр	[63]	1RL2
L4	<i>Tma</i>	1,7	α/β	Уникальный	[107]	1DMG
L6	<i>Bst</i>	2,6	α/β	РНП домены	[35]	1RL6
L7	<i>E. coli</i>	1,7	α/β	РНП домен	[47]	1CTF
L9	<i>Bst</i>	2,8	α/β	РНП домен/Уникальный	[43]	1DIV
L11	<i>Bst</i>	ЯМР	α/β	Хомеодомен	[54]	1FOW
L12	<i>Tma</i>	2	$\alpha + \alpha/\beta$	Coiled coil/РНП домен	[100]	1DD3
L14	<i>Bst</i>	1,7	β	β -цилиндр	[25]	1WHI
L22	<i>Tth</i>	2	α/β	РНП домен	[90]	1BXE
L25	<i>E. coli</i>	ЯМР	β	β -цилиндр	[85]	1B75
L30	<i>Bst</i>	2,5	α/β	РНП домен	[101]	нет
L30	<i>Tth</i>	1,9	α/β	РНП домен	[30]	1BYY
L36	<i>Tth</i>	ЯМР	α/β	Уникальный	[40]	1DFE
S4	<i>Bst</i>	ЯМР	$\alpha + \alpha/\beta$	Tet-репрессор/Ets DNAbd	[55]	1CO5
S5	<i>Bst</i>	2,7	α/β	DsRBD/EF-G	[75]	1PKP
S6	<i>Tth</i>	2	α/β	РНП домен	[49]	1RIS
S7	<i>Bst</i>	2,5	α/β	HU/INH	[44]	1HUS
S7	<i>Tth</i>	1,9	α/β	HU/INH	[104]	1RSS
S8	<i>Tth</i>	2,8	α/β	DNaseI, IF3/Уникальный	[65]	1AN7
S8	<i>Bst</i>	1,9	α/β	DNaseI, IF3/Уникальный	[24]	1SEI
S15	<i>Bst</i>	2,1	α	Coiled coil	[21]	1A32
S15	<i>Tth</i>	ЯМР	α	Coiled coil	[15]	1AB3
S16	<i>Tth</i>	ЯМР		Уникальный	[9]	1EMW
S17	<i>Bst</i>	ЯМР	β	OB fold	[36]	1RIP
S19	<i>Tth</i>	ЯМР	α/β	Уникальный	[41]	1QKF

* *Mja* — *Methanococcus jannaschii*, *Mth* — *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Tth* — *T. thermophilus*, *Bst* — *Bacillus stearothermophilus*, *Tma* — *Thermotoga maritima*

Таблица 2.
Структуры комплексов рибосомных белков с фрагментами РНК

Комплекс	Источник*	Разрешение, Å	Ссылка	Код PDB
L11-C76/ 23S рРНК	<i>Bst</i>	2,8	[23]	1QA6
L11/ 23S рРНК	<i>Tma</i>	2,57	[103]	1MMS
L25/ 5S рРНК	<i>E. coli</i>	ЯМР	[86]	1D6K
L25/ 5S рРНК	<i>E. coli</i>	1,8	[50]	1DFU
L30E/ мРНК Y132	<i>S. cerevisiae</i>	ЯМР	[52, 53]	1CN8
TL5/ 5S рРНК	<i>Tth/E. coli</i>	2,3	[29]	1FEU
S15/ 16S рРНК	<i>Tth</i>	2,8	[67]	1DK1
S6, S15, S18/ 16S рРНК	<i>Tth</i>	2,6	[5]	1EKC
S8/ 16S рРНК	<i>Mth</i>	37408	[87]	116U

* сокращение названия источника аналогично таблице 1.

Получение кристаллов рРНК-белковых комплексов, дающих дифракционную картину высокого разрешения, является весьма непростой задачей, которая иногда решается только после перебора множества фрагментов РНК и введения точечных мутаций в белок [72]. Трудности в получении и кристаллизации рРНК-белковых комплексов в значительной степени ограничивают прогресс этого весьма перспективного направления исследований структурных особенностей функционально важных участков рибосомы. Первый комплекс, содержащий белок L25 и фрагмент 5S рРНК из *E. coli*, был закристаллизован еще в 1983 г. [3], однако полученные кристаллы не были пригодны для рентгеноструктурных исследований. В настоящее время определено всего несколько структур рРНК-белковых комплексов (табл. 2).

В известных на настоящее время структурах рРНК-белковых комплексов рибосомные белки связываются как со сложными трехмерными структурами рРНК (S15, L11), так и с довольно простыми участками спирали рРНК, структура которых искажена за счет неканонических взаимодействий нуклеотидов (S8, L25, TL5).

Взаимодействия рибосомных белков с рРНК очень сильно отличаются от взаимодействий белков с ДНК и тРНК [93]. Места связывания белков на ДНК и тРНК характеризуются наличием специфической, эволюционно консервативной последовательности нуклеотидов, замена которых приводит к сильному ослаблению или исчезновению взаимодействий. Предположение об определяющей роли последовательности нуклеотидов в РНК-белковом узнавании, основанное на исследованиях комплексов белков-репрессоров с ДНК и

изучении аминоксил-тРНК-синтетаз, оказалось некорректным применительно к рРНК-белковым комплексам. В отличие от ДНК, рРНК содержит много нерегулярных участков, и рибосомные белки могут опознавать специфические конформации, образованные сахарофосфатным остовом таких участков.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА L11/23S рРНК

Рибосомный белок L11 участвует в формировании на рибосоме места связывания факторов элонгации EF-G и EF-Tu и антибиотика тиострептона. Белок L11 связывается с 23S рРНК в области соединения четырех спиралей. Структура комплекса L11 с фрагментом 23S рРНК была определена кристаллографически с разрешением 2,6 Å (рис. 3) [23, 103].

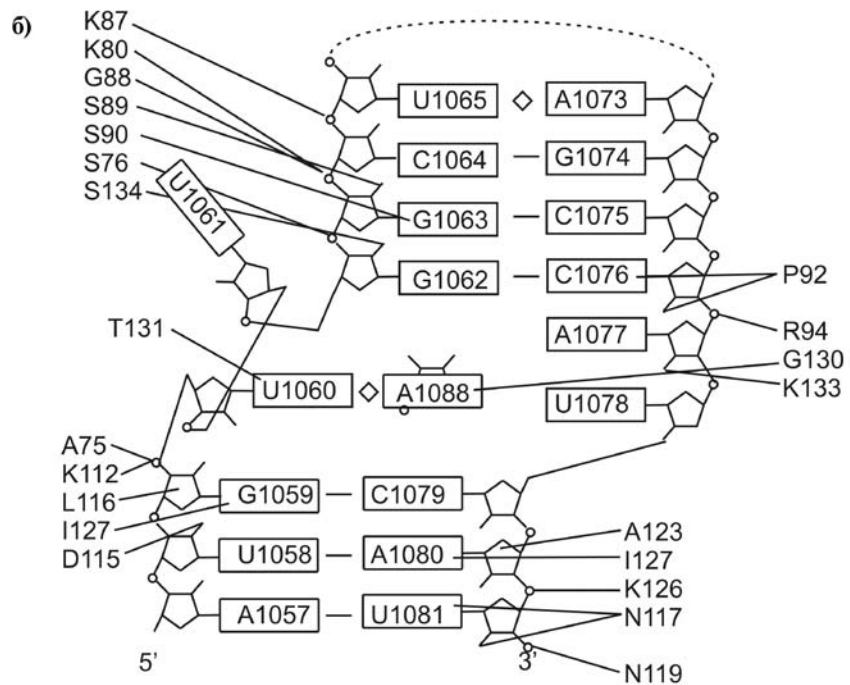
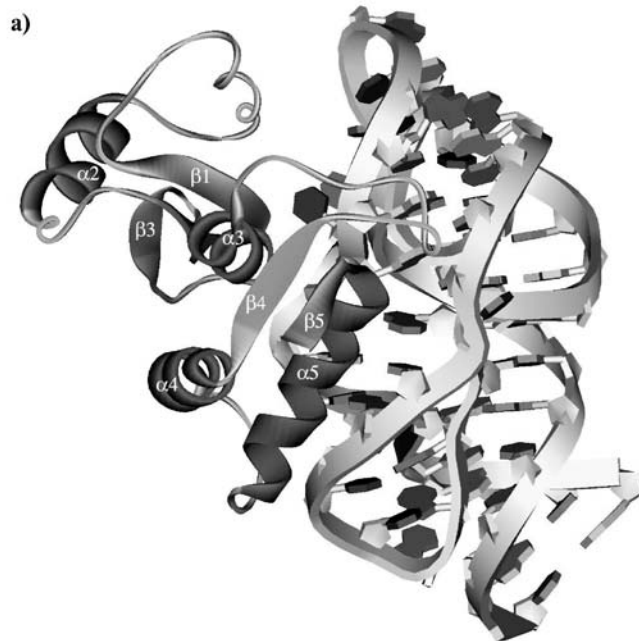
Фрагмент 23S рРНК, взаимодействующий с белком L11, представляет собой соединение четырех двойных спиралей. Спирали рРНК стыкуются попарно и образуют два удлинённых субдомена, собранных в один компактный домен. Пространственная структура фрагмента рРНК стабилизирована большим количеством связей между выпетливающимися нуклеотидами из двух субдоменов на протяжении всей области их контактов. В результате такой мощной сетки водородных связей данный фрагмент рРНК имеет компактную структуру даже в отсутствие белка L11 [16].

Белок L11 состоит из двух глобулярных доменов, соединённых довольно жесткой связкой. С 23S рРНК взаимодействует преимущественно С-концевой домен, в то время как N-концевой домен имеет всего несколько контактов с рРНК [103]. С-концевой домен связывается с малым желобком одной из спиралей РНК. В области взаимодействия с белком РНК искажена таким образом, что малый желобок спирали РНК сильно расширен и образует плоскость, с которой контактирует спираль $\alpha 5$ белка L11. При этом происходит взаимодействие двух достаточно плоских участков поверхностей белка и РНК, причем большая часть контактов приходится на атомы главной цепи

Рис. 3. Пространственная структура комплекса L11/23S рРНК из *T. maritima* [103].

а). Схематическое представление структуры комплекса. Обозначены некоторые элементы вторичной структуры белка L11. Область РНК-белковых контактов располагается на сильно расширенном малом желобке спирали 23S рРНК и спирали $\alpha 5$ белка L11.

б). Схема контактов между аминокислотными остатками белка L11 и 23S рРНК в области их взаимодействия. Контакты показаны линиями между аминокислотными остатками и соответствующими нуклеотидами рРНК. Большинство контактов приходится на атомы главной цепи белка и атомы сахарофосфатного остова РНК.



белка и атомы сахарофосфатного остова РНК. Таким образом, исходя из структуры комплекса, можно утверждать, что белок L11 специфически узнает конформацию остова 23S рРНК, а не последовательность оснований или выпетливающиеся нуклеотиды.

Исследования структуры С-концевого домена белка L11 в свободном состоянии методом ЯМР [42, 54] показали, что большая часть структуры белка в свободном и связанном состоянии совпадает. Исключением является подвижная петля, которая принимает участие в РНК-белковом взаимодействии. Эта петля при связывании с рРНК становится более упорядоченной и принимает конформацию α -спирали. Таким образом, в данном случае, структура белка несколько меняется при взаимодействии с рРНК.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА TL5/5S рРНК

TL5 является одним из трех рибосомных белков (L5, TL5, L18), которые специфически связываются с 5S рРНК в рибосомах из *T. thermophilus*. N-концевая часть белка TL5 гомологична белку L25 из *E. coli*. Белок TL5 имеет также гомологию по последовательности с семейством стрессовых белков СТС. Структура комплекса TL5-рРНК была определена кристаллографически с разрешением 2,3 Å (рис. 4) [29].

Область 5S рРНК, взаимодействующая с белком TL5 содержит так называемую «петлю Е», структура которой отличается от А-формы спирали в результате неканонических взаимодействий нуклеотидов, приводящих к уширению малого желобка и сужению большого примерно на 2 Å.

Во взаимодействии с 5S рРНК принимает участие только N-концевой домен белка TL5. Аминокислотные остатки одного из β -слоев обеспечивают плотный контакт с сахарофосфатным остовом и основаниями малого желобка 5S рРНК в области петли Е; остатки спирали $\alpha 1$ и смежной петли $\beta 1$ - $\alpha 1$ взаимодействуют с сахарофосфатным остовом рРНК.

Взаимодействующие с рРНК атомы пяти наиболее консервативных и некоторых неконсервативных остатков N-концевого домена лежат в одной плоскости, которая практически параллельна β -листу. Плоская область имеет значительные размеры и обладает заметной гидрофобностью. Соответствующие атомы фрагмента 5S рРНК также образуют плоскую поверхность, которая приблизительно параллельна плоскому участку на поверхности белка.

Интересно отметить, что в данном случае не происходит конформационных изменений в обеих молекулах при их взаимодействии. По всей видимости, стабилизация структуры 5S рРНК не является функцией белка TL5 в рибосоме.

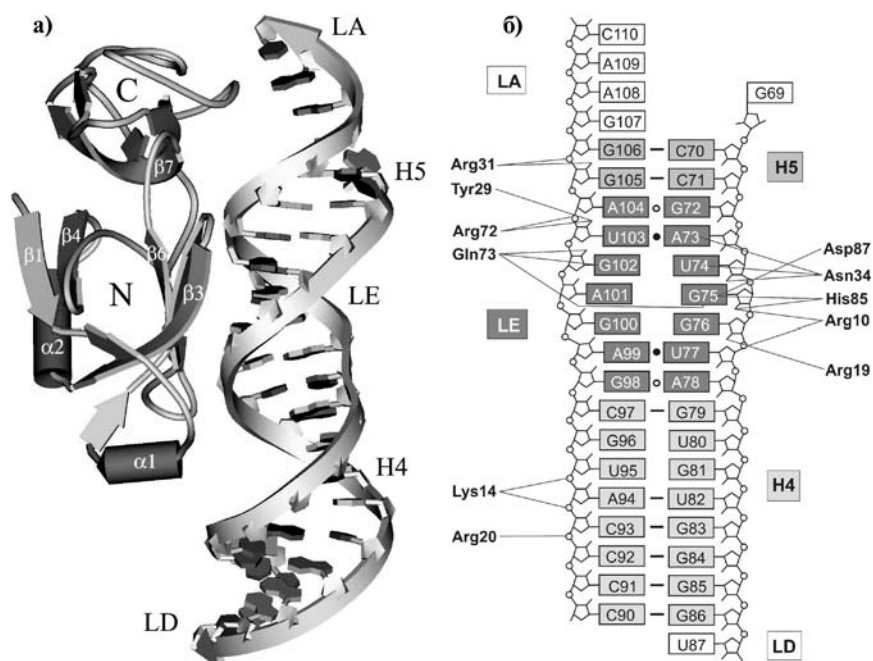


Рис. 4. Пространственная структура комплекса TL5/5S рРНК из *T. thermophilus* [29].

а). Схематическое представление структуры комплекса. Обозначены некоторые элементы вторичной структуры белка TL5, N – N-концевой домен, C – C-концевой домен белка. На фрагменте 5S рРНК обозначены спирали IV и V (соответственно H4 и H5) и петли А, Е и D (соответственно LA, LE и LD). С сахарофосфатным остовом и основаниями малого желобка 5S рРНК в области петли Е контактируют аминокислотные остатки β -слоя N-концевого домена белка TL5.

б). Схема контактов между аминокислотными остатками белка TL5 и 5S рРНК. Контакты показаны линиями между аминокислотными остатками и соответствующими нуклеотидами рРНК. Разным цветом выделены нуклеотиды, относящиеся к разным областям 5S рРНК – петлям А, Е и D, спиральям IV и V.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА S15/16S рРНК

Рибосомный белок S15 является первичным рРНК связывающим белком. Он, независимо от других рибосомных белков, связывается с центральным доменом 16S рРНК и входит в состав платформы малой субчастицы рибосомы. Этот белок необходим для сборки 30S субчастицы рибосомы и ассоциации рибосомных субчастиц в целую рибосому, кроме того белок S15 связывается с двумя участками 16S рРНК, одним из которых является место соединения трех спиралей — H20, H21, H22 [13, 78].

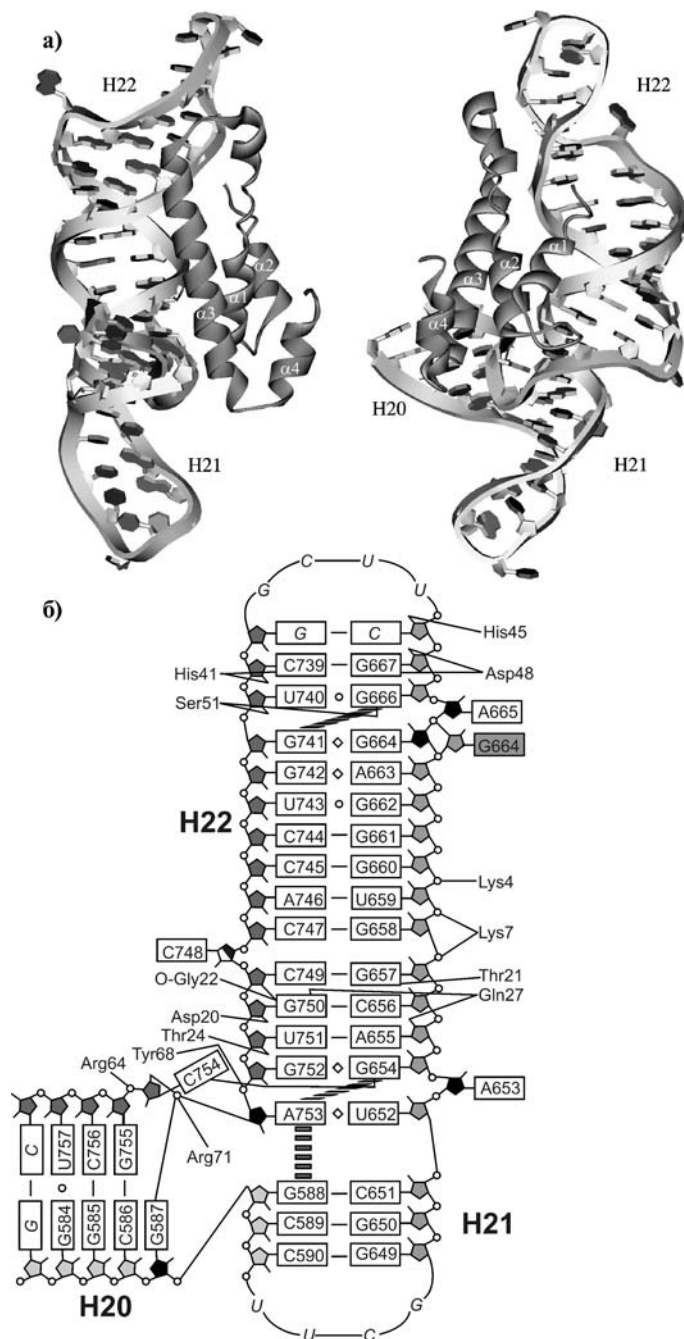
Структура комплекса S15-рРНК из *T. thermophilus* была определена кристаллографически с разрешением 2,8 Å (рис. 5) [67]. Белок S15 является однодоменным и состоит из 4 α -спиралей. При образовании комплекса белок не меняет свою структуру [67]. Однако имеются данные, что при связывании с белком S15 аналогичный фрагмент 16S рРНК в *E. coli* претерпевает существенные изменения [71]. В свободном состоянии углы между тремя спиральями рРНК составляют примерно 120°, в то время как в связанном состоянии две из трех спиралей рРНК состыкованы коаксиально, а третья спираль образует угол около 60°. В районе соединения трех спиралей рРНК имеется подвижный нуклеотид C754, который может взаимодействовать с нуклеотидом G587 той же спирали H20 (несвязанная форма рРНК), или взаимодействовать с G654 из другой спирали H22 (связанная с белком форма рРНК), образуя при этом триплет нуклеотидов. При изменении спаривания данного нуклеотида, происходит, по-видимому, изменение конформации соединений трех спиралей.

Один из двух участков связывания белка S15 находится в этой области соединения трех спиралей 16S рРНК, причем белок взаимо-

Рис. 5. Пространственная структура комплекса S15/16S рРНК из *T. thermophilus* [67].

а). Схематическое представление структуры комплекса. Обозначены элементы вторичной структуры белка s15. Схема справа повернута на 90° относительно левой. Спирали 16S рРНК H22 и H21 состыкованы коаксиально, а спираль H20 располагается под углом к ним. В верхней части модели хорошо заметно нарушение регулярной структуры А-формы спирали рРНК. Белок S15 узнает два района 16S рРНК: область соединения трех спиралей рРНК, и область чуть выше района уширения спирали рРНК.

б). Схема контактов между аминокислотными остатками белка S15 и 16S рРНК. Указаны спирали H20, H21 и H22 16S рРНК. Нумерация нуклеотидов дана по *E. coli*. Широкими прерывистыми линиями показаны стэкинг-взаимодействия между разными цепями рРНК. Нуклеотиды A665, C748 и A653 выходят из спирали рРНК. Нуклеотид G664 имеет две альтернативные конформации в кристаллической структуре комплекса. Основание нуклеотида G587 контактирует с фосфатом нуклеотида C754, в то время как основание C754 образует триплет с нуклеотидами G752 и G654 другой спирали.



действует преимущественно с сахарофосфатным остовом рРНК. Таким образом, в этом участке узнается не последовательность нуклеотидов, а определенная пространственная структура рРНК. По всей видимости, именно белок S15 отвечает за конформационное изменение структуры 16S рРНК в этом районе, которое может происходить при «переключении» спаривания нуклеотида C754.

Во втором участке связывания аминокислотные остатки петли $\alpha 2$ - $\alpha 3$ белка S15 специфически взаимодействуют с четырьмя высоко консервативными нуклеотидами – G666-U740/G667-C739 – со стороны малого желобка РНК, стабилизируя при этом уширение большого желобка и подготавливая место для посадки рибосомных белков S18 и S6 [5].

Таким образом, важная роль белка S15 в сборке платформы малой субчастицы рибосомы заключается, по-видимому, в фиксации места соединения трех спиралей 16S рРНК и стабилизации спирали H22 в конформации, которая нужна для взаимодействий с другими рибосомными белками.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА S8/16S рРНК

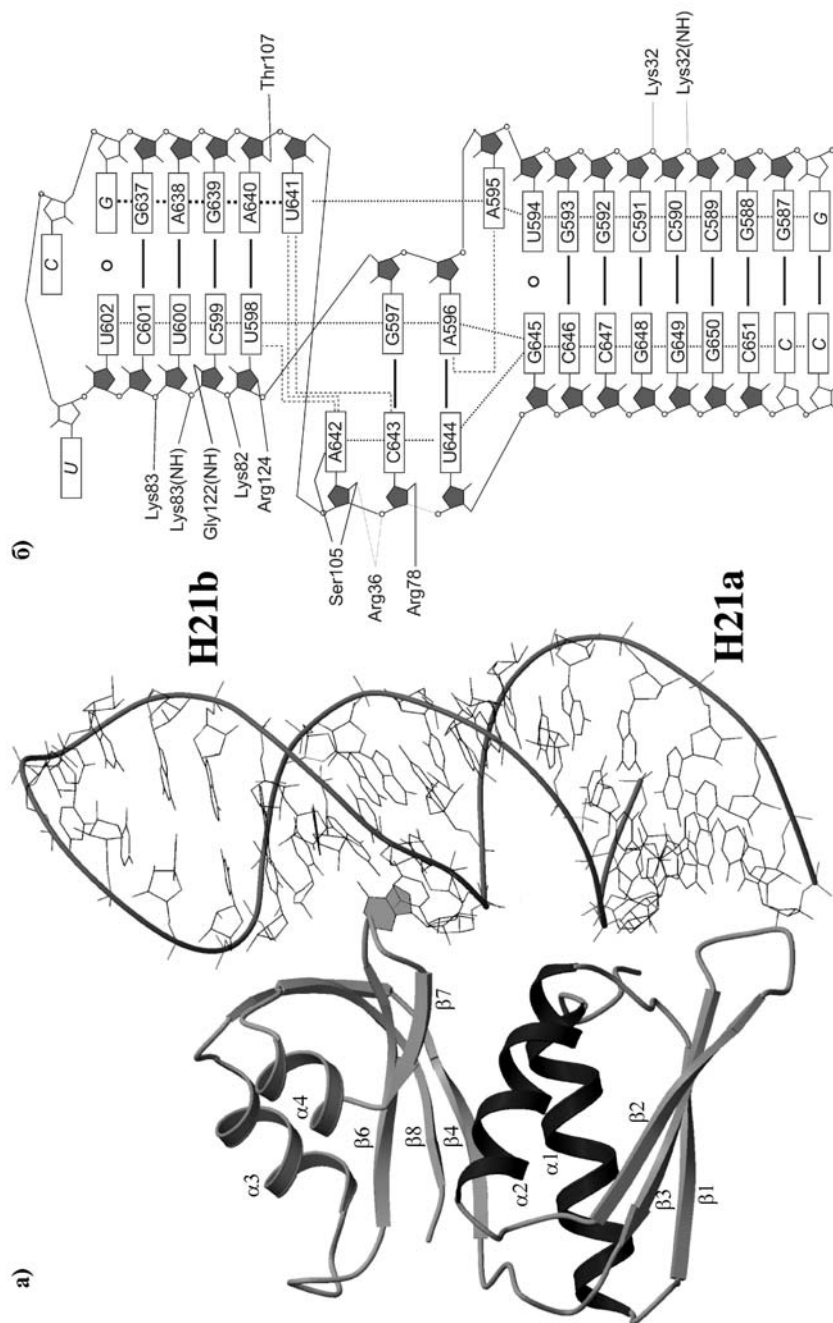
Рибосомный белок S8, также как белок S15, связывается с 16S рРНК независимо от остальных рибосомных белков с высокой специфичностью и необходим для дальнейшей посадки белков S5 и S12. Измерения констант диссоциации показали, что наличие спирали H21 является достаточным условием для специфического узнавания 16S рРНК белком S8 [45].

Пространственная структура рибосомного белка S8 в комплексе со специфическим фрагментом 16S рРНК из гипертермофильной археи *Methanococcus jannaschii* определена с разрешением 2,6 Å (рис. 6)

Рис. 6. Пространственная структура комплекса S8/16S рРНК из *T. thermophilus* [87].

а). Схематическое представление структуры комплекса. Обозначены элементы вторичной структуры белка S8 и спирали H21a и H21b 16S рРНК. В молекуле рРНК серым цветом выделено основание A642, выходящее из малого желобка. Белок взаимодействует с двумя соседними участками малого желобка 16S рРНК, образуя мостик над большим желобком рРНК.

б). Схема контактов между аминокислотными остатками белка S8 и 16S рРНК. Нумерация нуклеотидов дана по *E. coli*. Контакты показаны линиями между аминокислотными остатками и соответствующими нуклеотидами рРНК. Регулярная структура спирали H21 16S рРНК нарушена внутренней петлей, стабилизированной системой водородных связей, возникающей при образовании триплетов, и стэкинг-взаимодействиями ряда нуклеотидов петли. Широкими прерывистыми линиями показаны стэкинг-взаимодействия между нуклеотидами.



[87]. Белок S8 состоит из двух доменов. Структура белка S8 из *M. jannaschii* в составе комплекса очень близка к определенным ранее структурам белков в свободном состоянии из *T. thermophilus* и *B. stearothermophilus* [24, 65]. Следует отметить, что рибосомный белок S8 из *M. jannaschii* имеет 30% идентичности по аминокислотной последовательности с бактериальными белками и до 50% идентичности с эукариотическими белками S15a.

Главной особенностью бактериальных белков S8 является наличие междоменной петли, которая имеет максимальную длину в белке из *T. thermophilus*. Эта петля отсутствует у белка S8 из *M. jannaschii*. Наиболее варибельным участком в С-концевом домене является участок между стрэндами $\beta 4$ и $\beta 5$, который в белке из *T. thermophilus* практически неупорядочен и включает небольшой фрагмент спирали 3₁₀, а в белке из *M. jannaschii* образует классическую α -спираль.

Специфический фрагмент РНК представляет собой участок спирали H21 16S рРНК и содержит консервативный район связывания белка S8. Регулярная структура спирали рРНК нарушена большой внутренней петлей, стабилизированной мощной системой водородных связей, возникающей при образовании триплетов, и стэкинг-взаимодействиями ряда нуклеотидов петли. Интересно отметить, что ионы магния не были обнаружены в составе комплекса, хотя аналогичный фрагмент *E. coli* 16S рРНК в отсутствие ионов магния не структурирован. Это можно объяснить чрезвычайно высокой энергией стабилизации данного фрагмента 16S рРНК из *M. jannaschii* (-23 ккал вместо -3,4 ккал в *E. coli*).

Специфичность взаимодействия белка S8 с 16S рРНК обеспечивает С-концевой домен белка S8 и высоко консервативный участок 16S рРНК с нерегулярной структурой, которая и узнается белком. В пользу этого говорит то, что большинство контактов белок осуществляет с сахарофосфатным остовом рРНК. Единственным исключением является контакт Ser105 с аденином A642, который выходит из малого желобка в результате нарушения регулярной структуры спирали РНК и перекрестных стэкинг-взаимодействий. Уникальной особенностью взаимодействия белка S8 с 16S рРНК является стэкинг-взаимодействие главной цепи петли белка с выступающим A642.

Кроме взаимодействия с 16S рРНК в области С-концевого домена белка S8 имеется единственный контакт в области N-концевого домена. Этот контакт отстоит от главного места взаимодействия на один виток спирали РНК. Таким образом, белок S8 взаимодействует с двумя соседними участками малого желобка 16S рРНК, образуя мостик над большим желобком рРНК, при этом не происходит никаких значительных конформационных изменений в обеих молекулах.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы произошел прорыв в структурных исследованиях рибосом и рибосомных субчастиц. Благодаря достижениям рентгеновской кристаллографии оказалось возможным получить модели рибосомы и ее субчастиц с разрешением, близким к атомному. Это позволяет по-новому взглянуть на процесс биосинтеза белка и соотнести накопленные к настоящему времени биохимические данные со структурными. Особый интерес полученные результаты имеют для исследования РНК-белковых взаимодействий, которые до сих пор изучены достаточно слабо. Модели рибосомы дают весомую базу для анализа РНК-белковых взаимодействий, классификации типов укладок РНК и типов РНК-белковых контактов.

С другой стороны, для детального рассмотрения РНК-белковых взаимодействий могут быть использованы полученные с помощью методов рентгеноструктурного анализа модели РНК-белковых комплексов. Такие комплексы имеют значительно меньшие размеры по сравнению с рибосомой и рибосомными субчастицами, что позволяет определять структуру комплексов с высоким разрешением. Комплексы являются прекрасными объектами для целенаправленного изучения таких контактов с помощью сайт-специфического мутагенеза.

Анализ полученных к настоящему времени моделей структур комплексов рибосомных белков с рРНК позволяет сделать несколько предварительных выводов относительно принципов РНК-белковых взаимодействий. Во-первых, рибосомные белки, как правило, узнают не последовательность нуклеотидов, а специфическую конформацию сахарофосфатного остова рРНК. Во-вторых, консервативные нуклеотиды в рРНК чаще всего необходимы для формирования определенной пространственной структуры рРНК, которая узнается белками. В-третьих, структура рибосомных белков при взаимодействии с рРНК как правило не меняется. Изменения могут происходить только в петлях, которые в свободном состоянии являются неупорядоченными. В-четвертых, рибосомные белки стабилизируют структуру рРНК при связывании.

Автор выражает глубокую признательность С.В.Никонову, Н.А.Невской и М.Б.Гарбер за плодотворное обсуждение рукописи, а также Н. П.Фоменкову за ценные замечания и полезные рекомендации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Широков В. А., Гарбер М. Б. // Успехи биологической химии. 1991. Т. 32. С. 50–62.
2. Юсупов М.М., Траханов С.Д., Барынин В.В., Боровягин В.Л., Гарбер М.Б., Седельникова С.Э., Селиванова О.М., Тищенко С.В., Широков В.А., Единцов И.М. // Докл. АН СССР. 1987. Том 292. С. 1271–1274.
3. Abdel-Meguid S.S., Moore P.B., Steitz T.A. // J. Mol. Biol. 1983. Vol. 171. P. 207–215.
4. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 12892–12897.
5. Agalarov S.V., Prasad G.S., Funke P.V., Stout C.D., Williamson J.R. // Science. 2000. Vol. 288. P. 107–112.
6. Agrawal R.K., Lata R.K., Frank J. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999. Vol. 31. P. 243–254.
7. Agrawal R.K., Penczek P., Grassucci R.A., Frank J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 6134–6138.
8. Agrawal R.K., Penczek P., Grassucci R.A., Li Y., Leith A., Nierhaus K.H., Frank J. // Science. 1996. Vol. 271. P. 1000–1002.
9. Allard P., Rak A.V., Wimberly B.T., Clemons W.M. Jr., Kalinin A., Helgstrand M., Garber M.B., Ramakrishnan V., Hard T. // Structure Fold Des. 2000. Vol. 8. P. 875–882.
10. Ban N., Freeborn B., Nissen P., Penczek P., Grassucci R.A., Sweet R., Frank J., Moore P.B., Steitz T.A. // Cell. 1998. Vol. 93. P. 1105–1115.
11. Ban N., Nissen P., Hansen J., Capel M., Moore P.B., Steitz T.A. // Nature. 1999. Vol. 400. P. 841–847.
12. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A. // Science. 2000. Vol. 289. P. 905–920.
13. Batey R.T. & Williamson J.R. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 261. P. 550–567.
14. Beckmann R., Bubeck D., Grassucci R., Penczek P., Verschoor A., Blobel G., Frank J. // Science. 1997. Vol. 278. P. 2123–2226.
15. Berglund H., Rak A., Serganov A., Garber M., Hard T. // Nat. Struct. Biol. 1997. Vol. 4. P. 20–23.
16. Blyn L. B., Risen L.M., Griffey R.H., Draper D.E. // Nucleic Acids Res. 2000. Vol. 28. P. 17778–17784.
17. Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr., Carter A.P., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. // Cell. 2000. Vol. 103. P. 1143–1154.
18. Carter A.P., Clemons W.M., Brodersen D.E., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. // Nature. 2000. Vol. 407. P. 340–348.
19. Cate J.H., Gooding A.R., Podell E., Zhou K., Golden B.L., Kundrot C.E., Cech T.R., Doudna J.A. // Science. 1996. Vol. 273. P. 1678–1685.
20. Cate J.H., Yusupov M.M., Yusupova G.Zh., Earnest T.N., Noller H.F. // Science. 1999. Vol. 285. P. 2095–2104.
21. Clemons W. M., Davies C., White S. W., Ramakrishnan V. // Structure. 1998. Vol. 6. P. 429–438.
22. Clemons W.M.Jr., May J.L.C., Wimberly B.T., McCutcheon J.P., Capel M.S., Ramakrishnan V. // Nature. 1999. Vol. 400. P. 833–840.
23. Conn G. L., Draper D. E., Lattman E. E., Gittis A. G. // Science. 1999. Vol. 284. P. 1171–1174.
24. Davies C., Ramakrishnan V., White S.W. // Structure. 1996. Vol. 4. P. 1093–1104.
25. Davies C., White S. W., Ramakrishnan V. // Structure. 1996. Vol. 4. P. 55
26. Draper D.E. Ribosomal RNA: structure, evolution, processing and func-

- tion in protein biosynthesis. / Eds. R.A.Zimmermann, A.E.Dahlberg. Florida: CRC Press. 1996. P. 171–198.
27. Dube P., Bacher G., Stark H., Mueller F., Zemlin F., van Heel M., Brimacombe R. // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 279. P. 403–421.
28. Dube P., Wieske M., Stark H., Schatz M., Stahl J., Zemlin F., Lutsch G., van Heel M. // *Structure*. 1998. Vol. 6. P. 389–399.
29. Fedorov R., Meshcheryakov V., Gongadze G., Fomenkova N., Nevskaya N., Selmer M., Laurberg M., Kristensen O., Al-Karadaghi S., Liljas A., Garber M., Nikonov S. // *Acta Crystallogr. D*. 2001. Vol. 57. P. 968–976.
30. Fedorov R., Nevskaya N., Khairullina A., Tishchenko S., Mikhailov A., Garber M., Nikonov S. // *Acta Crystallogr. D*. 1999. Vol. 55. P. 1827–1833.
31. Frank J., Radermacher M., Wagenknecht T., Verschoor A. // *Methods Enzymol.* 1988. Vol. 164. P. 3–35.
32. Frank J., Zhu J., Penczek P., Li Y., Srivastata S., Verschoor A., Radermacher M., Grassucci R., Lata R.K. & Agrawal R.K. // *Nature*. 1995. Vol. 376. P. 441–444.
33. Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Spahn C. M., Grassucci R. A., Svergun D. I., Frank J., Penczek P. // *Cell*. 2000. Vol. 100. P. 537–549.
34. Gabashvili I.S., Agrawal R.K., Grassucci R.A., Frank J. // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 286. P. 1285–1291.
35. Golden B. L., Ramakrishnan V., White S. W. // *EMBO J.* 1993. Vol. 12. P. 4901–4908.
36. Golden B.L., Hoffman D.W., Ramakrishnan V., White S.W. // *Biochemistry*. 1997. Vol. 32. P. 12812–12820.
37. Gomez-Lorenzo M. G., Spahn C. M., Agrawal R. K., Grassucci R. A., Penczek P., Chakraborty K., Ballesta J. P., Lavandera J. L., Garcia-Bustos J. F., Frank J. // *EMBO J.* 2000. Vol. 19. P. 2710–2718.
38. Grimes J. M., Fuller S. D., Stuart D.I. // *Acta Crystallogr. D*. 1999. Vol. 55. P. 1742–1749.
39. Hansen H.A., Volkmann N., Piefke J., Glotz C., Weinstein S., Makowski I., Meyer S., Wittmann H.G., Yonath A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1990. Vol. 1050. P. 1–7.
40. Hard T., Rak A., Allard P., Kloo L., Garber M. // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 296. P. 169.
41. Helgstrand M., Rak A.V., Allard P., Davydova N., Garber M.B., Hard T. // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 292. P. 1071–1081.
42. Hinck A.P., Markus M.A., Huang S., Grzesiek S., Kustanovich I., Draper D.E., Torchia D.A. // *J. Mol. Biol.* 1997. Vol. 274. P. 101–113.
43. Hoffman D. W., Davies C., Gerchman S. E., Kycia J. H., Porter S. J., White S. W., Ramakrishnan V. // *EMBO J.* 1994. Vol. 13. P. 205–212.
44. Hosaka H., Nakagawa A., Tanaka I., Harada N., Sano K., Kimura M., Yao M., Wakatsuki S. // *Structure*. 1997. Vol. 5. P. 1199–1208.
45. Kalurachchi K., Nikonowicz E. P. // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 280. P. 639–654.
46. Lake J.A. // *J. Mol. Biol.* 1976. Vol. 105. P. 131–159.
47. Leijonmarck M., Liljas A. // *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 195. P. 555–579.
48. Lepault J., Booy F.P., Dubochet J. // *J. Microsc.* 1983. Vol. 129. P. 89–102.
49. Lindahl M., Svensson L. A., Liljas A., Sedelnikova S. E., Eliseikina I. A., Fomenkova N. P., Nevskaya N., Nikonov S. V., Garber M. B., Muranova T. A., Rykonova A. I. // *EMBO J.* 1994. Vol. 13. P. 1249–1254.

50. Lu M., Steitz T. A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 2023–2028.
51. Malhotra A., Penczek P., Agrawal R.K., Gabashvili I.S., Grassucci R.A., Jønnemann R., Burkhardt N., Nierhaus K.H. and Frank J. // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 280. P. 103–116.
52. Mao H., White S. A., Williamson J. R. // Nat. Struct. Biol. 1999. Vol. 6. P. 1139–1147.
53. Mao, H., Williamson, J. R. // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 292. P. 345–359.
54. Markus M. A., Hinck A. P., Huang S., Draper D. E., Torchia D. A. // Nat. Struct. Biol. 1997. Vol. 4. P. 70–77.
55. Markus M.A., Gerstner R.B., Draper D.E., Torchia D.A. // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 292. P. 375–387.
56. Matadeen R., Patwardhan A., Gowen B., Orlova E. V., Pape T., Cuff M., Mueller F., Brimacombe R., van Heel M. // Structure Fold. Des. 1999. Vol. 7. P. 1575–1583.
57. McCutcheon J. P., Agrawal R. K., Philips S. M., Grassucci R. A., Gerchman S. E., Clemons W. M. Jr, Ramakrishnan V., Frank J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 4301–4306.
58. McCutcheon J.P., Agrawal R.K., Philips S.M., Grassucci R.A., Gerchman S.E., Clemons W.M. Jr., Ramakrishnan V., Frank J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 96. P. 4301–4306.
59. Montesano-Roditis L., Glitz D.G., Traut R.R., Stewart P.L. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 14117–14223.
60. Morgan D. G., Menetret J. F., Radermacher M., Neuhof A., Akey I.V., Rapoport T. A., Akey C. W. // J. Mol. Biol. 2000. Vol. 301. P. 301–321.
61. Mueller F., Sommer I., Baranov P., Matadeen R., Stoldt M., Wohnert J., Gorlach M., van Heel M., Brimacombe R. // J. Mol. Biol. 2000. Vol. 298. P. 35–59.
62. N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz // Science 2000. Vol. 289. P. 905–920.
63. Nakagawa, A., Nakashima, T., Taniguchi, M., Hosaka, H., Kimura, M., Tanaka, I. // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 1459–1467.
64. Nevskaya N., Tishchenko S., Fedorov R., Al-Karadaghi S., Liljas A., Kraft A., Piendl W., Garber M. and Nikonov S. // Structure. 2000. Vol. 8. P. 363–371.
65. Nevskaya, N., Tishchenko, S., Nikulin, A., Al-Karadaghi, S., Liljas, A., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Garber, M., Nikonov, S. // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 279. P. 233–244.
66. Nikonov S., Nevskaya N., Eliseikina I., Fomenkova N., Nikulin A., Ossina N., Garber M., Jonsson B-H., Briand C., Al-Karadaghi S., Svensson A., Aevansson A, Liljas A. // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 1350–1359.
67. Nikulin A., Serganov A., Ennifar E., Tishchenko S., Nevskaya N., Shepard W., Portier C., Garber M., Ehresmann B., Ehresmann C., Nikonov N. and Dumas P. // Nat. Struct. Biol. 2000. Vol. 7. P. 273–277.
68. Nissen P., Ippolito J.A., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 4899–4903
69. Nomura M., Held W.A. Ribosomes. / Eds. M.Nomura, A.Tissieres, P.Lengyel. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1974. P. 193–224.
70. Orlova E. V. // Acta Crystallogr. D. 2000. Vol. 56. P. 1253–1258.
71. Orr J.W., Hagerman P.J. & Williamson J.R. // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 275. P. 453–464.
72. Oubridge C., Ito N., Evans P. R., Teo C-H., Nagai K. // Nature. 1994. Vol. 372. P. 432
73. Pioletti M, Schlunzen F, Harms J, Zarivach R, Gluhmann M, Avila H,

- Bashan A, Bartels H, Auerbach T, Jacobi C, Hartsch T, Yonath A, Franceschi F.* // EMBO J. 2001. Vol. 20. P. 1829–1839.
74. *Radermacher M., Wagenknecht T., Verschoor A., Frank J.* // J. Microsc. 1987. Vol. 146. P. 113–136.
75. *Ramakrishnan V., White S. W.* // Nature. 1992. Vol. 358. P. 768–771.
76. *Schluenzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F. and Yonath A.* // Cell. 2000. Vol. 102. P. 615–623.
77. *Schluenzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath A.* // Cell. 2000. Vol. 102. P. 615–623.
78. *Serganov A., Rak A., Garber M., Reinbolt J., Ehresmann B., Ehresmann C., Grunberg-Manago M. and Portier C.* // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 246. P. 291–300.
79. *Spahn C. M., Penczek P.A., Leith A., Frank J.* // Structure Fold. Des. 2000. Vol. 8. P. 937–948.
80. *Spahn C.M., Blaha G., Agrawal R.K., Penczek P., Grassucci R.A., Trieber C.A., Connell S.R., Taylor D.E., Nierhaus K.H., Frank J.* // Mol. Cell. 2001. Vol. 7. P. 1037–1045.
81. *Stark H., Orlova E.V., Rinke-Appel J., Junke N., Mueller F., Rodnina M., Wintermeyer W., Brimacombe R. and van Heel M.* // Cell. 1997. Vol. 88. P. 19–28.
82. *Stark H., Mueller F., Orlova E.V. Schatz M., Dube P., Erdemir T., Zemlin F., Brimacombe R. & van Heel M.* // Structure. 1995. Vol. 3. P. 815–821.
83. *Stark H., Rodnina M. V., Wieden H.J., van Heel M., Wintermeyer W.* // Cell. 2000. Vol. 100. P. 301–309.
84. *Stern S., Powers T., Changchien L.M., Noller H.F.* // Science. 1989. Vol. 244. P. 783–790.
85. *Stoldt M., Wohnert J., Gorlach M., Brown L.R.* // EMBO J. 1998. Vol. 17. P. 6377–6384.
86. *Stoldt M., Wohnert J., Ohlenschlager O., Gorlach M., Brown L. R.* // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 6508–6521.
87. *Tishchenko S., Nikulin A., Fomenkova N., Nevskaya N., Nikonov O., Dumas P., Moine H., Ehresmann B., Ehresmann C., Piendl W., Lamzin V., Garber M., Nikonov S.* // J. Mol. Biol. 2001. Vol. 311. P. 311–324.
88. *Trakhanov S., Yusupov M., Shirokov V., Garber M., Mitsler A., Ruff M., Thierry J.C., Moras D.* // J. Mol. Biol. 1989. Vol. 209. P. 327–328.
89. *Trakhanov S.D., Yusupov M.M., Agalarov S. Ch., Garber M.B., Ryazantsev S.N., Tishchenko S.V., Shirokov V.A.* // FEBS Lett. 1987. Vol. 220. P. 319–322.
90. *Unge J., Aberg A., Al-Karadaghi S., Nikulin A., Nikonov S., Davydova N., Nevskaja N., Garber M.* // Structure. 1998. Vol. 6. P. 1577–1586.
91. *Unge J., Al-Karadaghi S., Liljas A., Jonsson B-H., Eliseikina I., Ossina N., Nevskaya N., Fomenkova N., Garber M. and Nikonov S.* // FEBS Lett. 1997. Vol. 411. P. 53–59.
92. *van Heel M.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2000. Vol. 10. P. 259–264
93. *Varani G.* // Accounts of chemical research. 1997. Vol. 30. P. 189–195.
94. *Vasiliev V.D.* // Acta. Biol. Med. Germ. 1974. Vol. 33. P. 779–793.
95. *Vasiliev V.D., Selivanova O.M., Baranov V.I., Spirin A.S.* // FEBS Lett. 1983. Vol. 155. P. 167–172.
96. *Vasiliev V.D., Selivanova O.M., Ryazantsev S.N.* // J. Mol. Biol. 1983. Vol. 171. P. 561–569.
97. *Verschoor A., Srivastata S., Grassucci R. and Frank J.* // J. Cell Biol. 1996. Vol. 133. P. 495–505.

98. *Verschoor A., Warner J.R., Srivastava S., Grassucci R.A., Frank J.* // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. P. 655–661
99. *Volkman N., Hottentrager S., Hansen H.A.S., Zaytsev-Bashan A., Sharon R., Berkovitch-Yellin Z., Yonath A., Wittmann H.G.* // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 216. P. 239–241.
100. *Wahl M.C., Bourenkov G.B., Bartunik H.D., Huber R.* // *EMBO J.* 1999. Vol. 19. P. 174–186.
101. *Wilson K.S., Appelt K., Badger J., Tanaka I., White S.W.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83. P. 7251–7255.
102. *Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons Jr. W. M., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vornrhein C., Hartschk T. & Ramakrishnan V.* // *Nature.* 2000. Vol. 407. P. 327–339.
103. *Wimberly B. T., Guymon R., McCutcheon J.P., White, S. W., Ramakrishnan, V.* // *Cell.* 1999. Vol. 97. P. 491–502.
104. *Wimberly B. T., White S. W., Ramakrishnan V.* // *Structure.* 1997. Vol. 5. P. 1187–1198.
105. *Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vornrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V.* // *Nature.* 2000. Vol. 407. P. 327–339.
106. *Wittmann H.G., Mussig J., Gewitz H.S., Piefke J., Rheinberger H-J. and Yonath A.* // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 146. P. 217–220.
107. *Worbs M., Huber R. and Wahl M.* // *EMBO J.* 2000. Vol. 19. P. 807–818.
108. *Wower J., Hixson S. S., Zimmermann R.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1989. Vol. 86. P. 5232–5236.
109. *Wriggers W., Agrawal R. K., Drew D. L., McCammon A., Frank J.* // *Biophys. J.* 2000. Vol. 79. P. 1670–1678.
110. *Yonath A, Leonard K.R, Wittmann H.G.* // *Science.* 1987. Vol. 236. P. 813–816.
111. *Yonath A., Glotz C., Gewitz H.S., Barteles K.S., Von Bohlen K., Makowski I., Wittmann H.G.* // *J. Mol. Biol.* 1988. Vol. 203. P. 831–834.
112. *Yonath A., Missing J., Teshe B., Lorenz S., Erdmann V. and Wittmann H.G.* // *Biochem. Int.* 1980. Vol. 1. P. 428–435.
113. *Yusupov M. M., Yusupova G. Zh., Baucorn A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J.H.D., Noller H. F.* // *Science.* 2001. Vol. 292. P. 883–896.
114. *Yusupov M.M., Garber M.B., Vasiliev V.D., Spirin A.S.* // *Biochimie.* 1991. Vol. 73. P. 887–897.
115. *Yusupov M.M., Tischenko S.V., Trakhanov S.D., Ryazantsev S.N., Garber M.B.* // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 238. P. 113–115.
116. *Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucorn A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H., Noller H.F.* // *Science.* 2001. Vol. 292. P. 883–896.
117. *Zimmermann R.A. Ribosomes.* / Eds. M.Nomura, A.Tissieres, P.Lengyel. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1974. P. 225–269.