

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет естественных наук

**Д. М. Грайфер, Н. А. Моор**

**БИОСИНТЕЗ БЕЛКА**

Учебное пособие

Новосибирск

2011

ББК Е902я73-1

УДК 577.1 (075)

Г757

**Грайфер Д. М., Моор Н. А.** Биосинтез белка: учебное пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2011. 104 с.

Учебное пособие предназначено для студентов факультета естественных наук, изучающих биоорганическую химию, молекулярную биологию и биохимию, для студентов старших курсов, специализирующихся на кафедре молекулярной биологии. Пособие может быть использовано для самостоятельного изучения, подготовки вступительного экзамена в аспирантуру и кандидатского минимума. Представленные материалы будут полезны для преподавателей, аспирантов и научных сотрудников химического и биологического профиля других вузов и научно-исследовательских институтов.

Рецензент

д-р хим. наук, проф. Г. Г. Карпова

Издание подготовлено в рамках реализации *Программы развития НИУ-НГУ* при поддержке базовой кафедры молекулярной биологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

© Новосибирский государственный университет, 2011  
© Грайфер Д. М., Моор Н. А., 2011

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ЧАСТЬ I. АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ	9
Глава 1. Общие схемы реакции аминоацилирования тРНК	9
Глава 2. Структура тРНК	11
Глава 3. Два класса аминоацил-тРНК-синтетаз: структурные признаки и Общие характеристики взаимодействия с изкомолекулярными субстратами	16
Глава 4. Взаимодействие аминоацил-тРНК-синтетаз и тРНК. Проблема узнавания	23
4.1. Элементы специфичности в тРНК и методы их определения	23
4.2. Элементы узнавания тРНК в аминоацил-тРНК-синтетазах	32
4.3. Структура комплексов синтетаз с тРНК	34
4.4. Влияние низкомолекулярных субстратов на взаимодействие амино- ацил-тРНК-синтетаз с акцепторным концом тРНК	40
Глава 5. Неканонические функции аминоацил-тРНК-синтетаз	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	52
ЧАСТЬ II. РИБСОМА И БИОСИНТЕЗ БЕЛКА	55
Глава 1. Этапы трансляции	55
1.1. Основные участники синтеза белка на рибосоме	55
1.2. Инициация	57
1.2.1. Регуляция трансляции на стадии инициации	58
1.2.2. Внутренняя инициация трансляции у эукариот	60
1.3. Элонгация	61
1.4. Терминация	63
1.4.1. Прочтение стоп-кодона в качестве смыслового	65
1.5. Выход синтезированного полипептида из рибосомы	67
Глава 2. Структура рибосомы	67
2.1. рРНК	70
2.1.1. Вторичная структура рРНК	70
2.1.2. Роль рРНК в структурной организации и функционировании рибосом	71
2.2. Рибосомные белки	72
2.2.1. Номенклатура и особенности рибосомных белков	73
2.2.2. Гомология между рибосомными белками эукариот, эубактерий и архей	75
2.2.3. Внерибосомные функции рибосомных белков	75
2.3. Ионы $Mg^{2+}$ и полиамины	76
Глава 3. Сборка рибосомы	78
Глава 4. Методы изучения строения рибосомы и ее функциональных центров	80
4.1. Рентгеноструктурный анализ (РСА)	80
4.2. Электронная микроскопия	82
4.3. Футпринтинг	83

4.4. Аффинная модификация	85
4.4.1. Аналоги тРНК	88
4.4.2. Аналоги мРНК	89
4.5. Другие методы исследования рибосом	92
Глава 5. Функциональные центры рибосомы и принципы их организации	92
Глава 6. Рибосома и антибиотики	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	102

## ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим процессом жизнедеятельности всех организмов – от простейших бактерий до человека – является реализация их генетической информации, закодированной в ДНК. Заключительным этапом этого процесса является трансляция – перевод тринуклеотидной последовательности кодонов матричных РНК (мРНК), скопированных с ДНК, – в аминокислотные последовательности синтезируемых белков. Белки – строительные, ферменты, гормоны – определяют практически все признаки организма, регулируют и координируют его жизнедеятельность. Трансляция происходит на специальных клеточных молекулярных машинах – рибосомах, куда аминокислоты для синтеза полипептидных цепей белка доставляются транспортными РНК (тРНК) в виде аминоацил-тРНК, в которых аминокислотный остаток соединен с 3'-концевой рибозой через сложноэфирную связь. Каждая тРНК специфична к одной определенной аминокислоте; для аминоацилирования тРНК в клетке есть специализированные ферменты – аминоацил-тРНК-синтетазы, каждая из которых селективно присоединяет «свой» аминокислотный остаток к соответствующей тРНК.

Начало изучения процесса трансляции можно отнести к концу 50-х годов XX века. Термин «рибосома» был введен в 1958 г. для описания рибонуклеопротеидных частиц размером 10–20 нм, которые были впервые выделены в начале 40-х годов из супернатанта, полученного после центрифугирования гомогената, образованного при разрушении нормальных и опухолевых клеток эукариот. В начале 50-х годов было обнаружено, что именно на этих частицах происходит синтез белка в клетках эукариот, в то время как для бактериальных клеток аналогичные данные удалось получить лишь в конце 50-х годов. тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы были открыты в середине 50-х годов. В 60-е годы были выполнены выдающиеся по своему значению исследования: расшифрованы кодоны для всех аминокислот, открыты мРНК, доказана адапторная функция тРНК, выяснены основные этапы биосинтеза белка на рибосомах. Среди всех нуклеиновых кислот впервые для тРНК в середине 70-х годов была установлена трехмерная структура с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА). За прошедшее с тех пор время накоплено огромное количество данных о строении рибосом – уникальных рибонуклеопротеидов, обладающих сложнейшей структурой и состоящих из большой и малой субчастиц, каждая из которых содержит рибосомные РНК (рРНК) и несколько десятков белков.

К концу XX века были установлены аминокислотные последовательности всех рибосомных белков и огромного числа аминоацил-тРНК-синтетаз, а также нуклеотидные последовательности тРНК и рРНК многих организмов от кишечной палочки до человека, выполнен трехмерный анализ структуры ряда аминоацил-тРНК-синтетаз с помощью РСА. Именно для аминоацил-тРНК-синтетаз впервые установлены молекулярные принципы взаимодействия белков с РНК, исключительная избирательность которого обусловлена уникальным разнообразием химической структуры и тРНК, и ферментов. Наиболее впечатляющие успехи в расшифровке структуры рибосом достигнуты на рубеже XX и XXI столетий благодаря РСА, который позволил установить строение рибосом прокариот с

разрешением, дающим возможность «видеть» каждый нуклеотид рРНК и аминокислотный остаток белков. До настоящего времени (2010 г.) рибосома является наиболее сложной клеточной структурой, строение которой расшифровано на уровне отдельных атомов. В 2009 г. трое ученых (В. Рамакришнан из Англии, Т. Стейц из США и А. Йонат из Израиля) получили Нобелевскую премию по химии за установление строения бактериальной рибосомы.

Вся информация о белковом синтезе, накопленная к 80-м годам XX века (о генетическом коде и его свойствах, структуре тРНК, кинетических аспектах и механизмах высокоспецифичного функционирования аминоацил-тРНК-синтетаз, энергетике трансляции, локализации рибосом в клетке и др.), дана в монографии Л. Л. Киселева, О. О. Фаворовой и О. И. Лаврик «Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК» (Москва: Наука, 1984. 408 с.) и фундаментальном учебнике А. С. Спирина «Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка» (Москва: Высшая школа, 1986. 302 с.). В настоящем пособии акцент сделан на кратком описании полученных в последнее десятилетие XX века и первое десятилетие XXI века представлений о молекулярных основах внерибосомного и рибосомного этапов биосинтеза белка. Первая часть пособия «Аминоацил-тРНК-синтетаза: структура и функции» написана Н. А. Моор, вторая часть «Рибосома и биосинтез белка» – Д. М. Грайфером.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

## *1. Русскоязычные сокращения*

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
НТО – нетранслируемая область  
ПТЦ – пептидилтрансферазный центр  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота  
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота  
РСА – рентгеноструктурный анализ  
ТМ-домен – трансмембранный домен  
УФ-свет – ультрафиолетовый свет  
ШД-последовательность – последовательность Шайна-Далгарно  
ЭМ – электронная микроскопия  
ЭР – эндоплазматический ретикулум  
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

## *2. Англоязычные и смешанные сокращения*

aaRS(s) – аминоацил-тРНК-синтетаза(ы)  
aa – аминокислота  
aa-AMP – аминоациладенилат  
aa-тРНК – аминоацил-тРНК  
A-участок – аминоацильный участок  
АТР (AMP) – аденозин-5'-три(моно)фосфат  
E-участок – участок связывания деацилированной тРНК  
IRES-элемент – внутренний участок посадки рибосомы  
РАВР – поли(А)-связывающий белок  
Р-участок – пептидильный участок рибосомы  
PheRS(s) – фенилаланил-тРНК-синтетаза(ы); аналогичное сокращение используется для других аминоацил-тРНК-синтетаз с указанием их специфичности в соответствии с общепринятым трехбуквенным обозначением аминокислот  
PP<sub>i</sub> – неорганический пирофосфат  
тРНК<sup>Phe</sup> – специфичная к фенилаланину тРНК; аналогичное сокращение используется для других тРНК с указанием специфичности в соответствии с общепринятым трехбуквенным обозначением аминокислот

## *3. Обозначения структурных компонентов нуклеиновых кислот*

A – аденозин  
C – цитидин  
G – гуанозин  
U – уридин

#### *4. Трех(одно)буквенные обозначения стандартных и нестандартных аминокислот*

Ala (A) – аланин  
Arg (R) – аргинин  
Asp (D) – аспарагиновая кислота  
Asn (N) – аспарагин  
Cys (C) – цистеин  
Glu (E) – глутаминовая кислота  
Gln (Q) – глутамин  
Gly (G) – глицин  
His (H) – гистидин  
Ile (I) – изолейцин  
Leu (L) – лейцин  
Lys (K) – лизин  
Met (M) – метионин  
Phe (F) – фенилаланин  
Pro (P) – пролин  
Pyl (O) – пирролизин  
Sec (U) – селеноцистеин  
Ser (S) – серин  
Sep – фосфосерин  
Trp (W) – триптофан  
Tyr (T) – тирозин  
Val (V) – валин

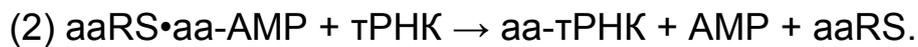
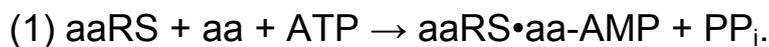
Обозначения структурных компонентов нуклеиновых кислот и белков соответствуют рекомендациям Комиссии по номенклатуре Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (IUBMB). Обозначения структурных доменов аминоксил-тРНК-синтеаз расшифрованы в тексте и соответствуют принятым в оригинальных работах.

## ЧАСТЬ I

### АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

#### Глава 1. Общие схемы реакции аминокислотирования тРНК

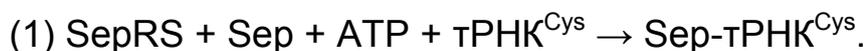
Основной путь синтеза аминокислот-тРНК в ходе биосинтеза белков – это двухстадийный процесс этерификации адапторной молекулы тРНК специфичной аминокислотой, катализируемый соответствующей аминокислот-тРНК-синтетазой (aaRS). На первой стадии аминокислота (aa) активируется АТФ с образованием связанного ферментом смешанного ангидрида – аминокислотаденилата (aa-AMP) – и освобождением пироглутамата (PP<sub>i</sub>); на второй стадии аминокислотный остаток переносится на 3'-концевую рибозу соответствующей тРНК:



Как правило, каждой аминокислоте соответствует своя тРНК (или в некоторых случаях несколько тРНК, называемых изоакцепторными [1, 2]) и своя aaRS, и в клетке существует 20 ферментов, специфичных к стандартным аминокислотам. Исключениями являются отсутствие во многих бактериях и органеллах эукариот глутаминил-тРНК-синтетазы (GlnRS) и аспарагинил-тРНК-синтетазы (AsnRS), а в ряде археобактерий – цистеинил-тРНК-синтетазы (CysRS) [3, 4]. В этих случаях Gln-тРНК<sup>Gln</sup> и Asn-тРНК<sup>Asn</sup> синтезируются с участием так называемых «недискриминирующих» глутамил- и аспартил-тРНК-синтетаз (ND\_GluRS и ND\_AspRS), способных присоединять «свою» аминокислоту к «чужой» тРНК – Glu и Asp к тРНК<sup>Gln</sup> и тРНК<sup>Asn</sup> соответственно. Недискриминирующие синтетазы существуют в таких организмах наряду с обычными, дискриминирующими, ферментами (GluRS и AspRS). На следующей стадии происходит амидирование Glu-тРНК<sup>Gln</sup> и Asp-тРНК<sup>Asn</sup> с участием соответствующих амидотрансфераз (Glu-AdT и Asp-AdT), как показано на приведенной схеме:

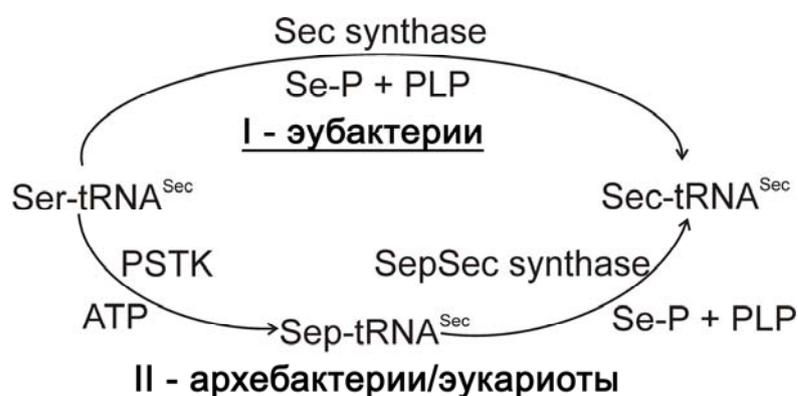


Необычный путь синтеза Cys-тРНК<sup>Cys</sup> без участия CysRS открыт недавно [4]. Он включает ошибочное аминокислотирование тРНК<sup>Cys</sup> фосфосерином (Sep) в присутствии фосфосерил-тРНК-синтетазы (SepRS) и последующее тРНК-зависимое превращение Sep в Cys, катализируемое Sep-тРНК:Cys-тРНК-синтазой (Sep-CysS):



Кофактором синтазы Ser-CysS является пиридоксаль-5'-фосфат (PLP на схеме), а природа донора серы пока не установлена.

Для включения в белки селеноцистеина (Sec) – 21-й нестандартной аминокислоты – сначала из тРНК<sup>Sec</sup> в присутствии SerRS синтезируется Ser-тРНК<sup>Sec</sup> [4], которая затем превращается в Sec-тРНК<sup>Sec</sup> альтернативными способами, представленными на приведенной ниже схеме. В эубактериях эта реакция катализируется PLP-зависимой Sec-синтазой. Более сложный механизм реакции в архебактериях и эукариотах включает промежуточное фосфорилирование Ser-тРНК<sup>Sec</sup> в присутствии специальной киназы (PSTK на схеме) и последующий синтез конечного продукта с участием PLP-зависимой Sep-тРНК:Sec-тРНК-синтазы. В обоих случаях донором селена является селенофосфат (Se-P на схеме), синтезируемый в клетке специальным ферментом из селенида водорода.



Другая нестандартная аминокислота, кодируемая генами некоторых метаногенных архебактерий, – производное лизина пирролизин (Pyl) – включается специфически в «свою» тРНК<sup>Pyl</sup> соответствующим ферментом пирролизил-тРНК-синтазой (PylRS) по обычному двухступенчатому механизму.

## Глава 2. Структура тРНК

База данных по тРНК, обновленная в 2009 г. (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de>), содержит более 12000 последовательностей (установленных в основном на основе генов) из более чем 600 организмов. Вторичная структура тРНК прокариот и цитоплазмы эукариот укладывается в форму «клеверного листа» (рис. 1.1), состоящую из 4-х двуспиральных элементов, 3 из которых заканчиваются петлями, и варибельного района (V-ветви).

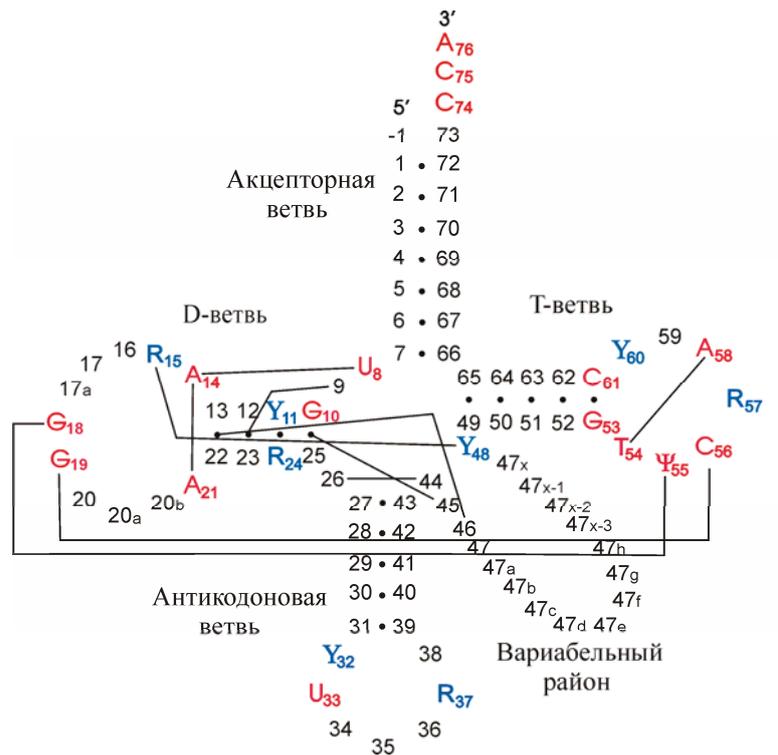


Рис. 1.1. Обобщенный вид вторичной структуры канонических тРНК. Показаны в соответствии с общепринятой нумерацией консервативные (красного цвета) и полуконсервативные нуклеотиды (синего цвета; R – пурин, Y – пиримидин). Точки и линии соединяют основания, образующие пары во вторичной и третичной структуре соответственно

Длина канонических тРНК варьирует от 72 до 95 нуклеотидов из-за различий в размерах D-петли и V-ветви, и в зависимости от длины последней они делятся на два класса: класс I объединяет тРНК с короткой V-петлей (4–5 нуклеотидных звеньев); ко второму классу относятся тРНК<sup>Leu</sup>, тРНК<sup>Ser</sup> и эубактериальные тРНК<sup>Tyr</sup> с длинной V-ветвью (13 и более звеньев). Двухцепочечные районы состоят в основном из уотсон-криковских пар и часто содержат «wobble»-пару G-U, структурная неустойчивость которой важна для функционирования. Структура некоторых тРНК прокариот и цитоплазмы эукариот отличается незначительно от канонической структуры: тРНК<sup>Cys</sup> содержит необычную пару G15-G48 (вместо обращенной пары Уотсона-Крика R15-Y48); тРНК<sup>His</sup> в большинстве организмов имеет дополнительный нуклеотид на 5'-конце (в пози-



молекулы находятся функционально важные районы – акцепторный конец и антикодон. Трехмерная структура стабилизирована девятью парами оснований (табл. 1.1), называемых третичными, в отличие от тех, которые поддерживают вторичную структуру двуспиральных участков; все они, за исключением пары G19-C56, не относятся к каноническим (уотсон-криковским). Многочисленные взаимодействия путем образования водородных и координационных связей, в которые вовлечены 2'-ОН-группы и фосфатные группы рибозофосфатного скелета и ионы металла, дополнительно стабилизируют третичную структуру. Большинство оснований тРНК (кроме D16, D17, G20, U47 и A76) находится в стэкинге (взаимодействуют своими плоскостями), что обеспечивает высокую упорядоченность не только спиральных, но и одноцепочечных районов.

Таблица 1.1

**Взаимодействия нуклеотидов, стабилизирующие третичную структуру тРНК<sup>Phe</sup>**

U8-A14	обращенная пара Хугстина, стабилизируемая дополнительной Н-связью между атомами O2' U8 и N1 A21
A9-A23-U12	A9 взаимодействует с A23, образующим вторичную пару с U12
G45-G10-C25	G10 вторичной пары G10-C25 образует некомпланарную пару с G45
C13-G22-G46	G22 вторичной пары C13-G22 образует две Н-связи с G46
G15-C48	обращенная пара Уотсона-Крика
G18-Ψ55	Н-связи между атомами N2 и/или N1 G18 и O4 Ψ55
G19-C56	искаженная пара Уотсона-Крика
G26-A44	некомпланарная пурин-пуриновая пара
U54-A58	обращенная пара Хугстина

Спустя четверть века структура дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> была проанализирована вновь с помощью более совершенных методов, дающих высокое разрешение [5, 6]. Результаты двух параллельных исследований подтвердили ранее полученную структурную информацию и позволили описать геометрию участков связывания всех двухвалентных катионов и роль молекул воды в стабилизации структуры тРНК. Четыре прочно связанных иона Mg<sup>2+</sup> локализованы одинаково в новых и старых моделях, тогда как число слабо связанных Mg<sup>2+</sup>-ионов и способы их координации варьируют в зависимости от условий, использованных для кристаллизации тРНК. Обнаружены участки связывания ионов Co<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> в вариабельной и антикодоновой петлях и в акцепторном стебле (см. рис. 1.2, б). В присутствии ионов Co<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> наряду с ионами Mg<sup>2+</sup> (в кристаллизационном буфере) меняется ориентация основания D16, образующего дополнительную третичную пару с U59. Молекула спермина (полиамина, необходимого для кристаллизации тРНК) стабилизирует структуру Т-ветви (см. рис. 1.2, а) и опосредует межмолекулярные контакты двух молекул тРНК в элементарной ячейке. В хорошо структурированных районах тРНК найдены молекулы воды, образующие водородные связи с основаниями и рибозофосфатным скеле-

том. Из данных РСА извлечена информация о тепловой подвижности (температурной флуктуации) отдельных нуклеотидов тРНК (см. рис. 1.2, в). Повышенная подвижность акцепторного конца и антикодона необходима для осуществления акцепторной и адапторной функций тРНК.

К 2010 г. установлена пространственная структура 20-ти тРНК, различающихся по специфичности и происхождению, в свободном виде или в комплексах с разными белками [2, 3, 7]. Их трехмерные структуры, стабилизируемые взаимодействиями консервативных и полуконсервативных нуклеотидов, похожи, но не идентичны; различия обусловлены нуклеотидной последовательностью, длиной варьирующих районов цепи, связанными лигандами и, возможно, другими факторами. Многочисленные исследования структуры тРНК в растворе с помощью набора взаимодополняющих методов (ядерный магнитный резонанс, спектроскопия, флуоресценция, электронная микроскопия, динамическое двойное лучепреломление, гидродинамические методы, химическая модификация, изотопный обмен, нуклеазный гидролиз и др.) были начаты до установления первичной и трехмерной структур. Их результаты обобщены в ряде обзоров [1, 2, 8]. В целом, наблюдается полное соответствие данных РСА и исследований в растворе для одной и той же тРНК. Работы двух последних десятилетий, выполненные с использованием синтетических фрагментов тРНК, содержащих минорные компоненты, и синтезированных *in vitro* тРНК-транскриптов (с использованием РНК-полимеразы фага Т7 и синтетических ДНК-матриц, несущих последовательность тРНК), содержащих только 4 канонических нуклеотида, направлены на изучение конформационной динамики тРНК и ее функциональной значимости. Для различных тРНК показано, что модифицированные основания в антикодонной и Т-ветвях стабилизируют локальную структуру. Так, конформационная стабильность нуклеотидов в положениях 34 и 37 антикодонной петли важна для обеспечения точности кодон-антикодонного взаимодействия в рибосоме. ЯМР-исследования структуры дуплексов, имитирующих акцепторную ветвь разных тРНК, показали, что природа основания в положении 73 определяет конформацию одноцепочечного 3'-конца и его подвижность, необходимую для аминокислотирования. По данным моделирования молекулярной динамики для природной дрожжевой тРНК<sup>Asp</sup> вторичные и третичные пары оснований устойчивы, тогда как тройки оснований склонны к образованию альтернативных водородных связей и вследствие этого структурно лабильны. Благодаря неустойчивости некоторых третичных связей между D- и Т-петлями структура тРНК обладает достаточной степенью молекулярной подвижности, которая позволяет менять расстояние между нуклеотидами двух непрерывных спиралей. На основании гидродинамических исследований предполагается, что конформационные изменения тРНК могут быть обусловлены изменением геометрии связывания молекул воды и дегидратацией макромолекулы. Молекулы воды составляют, таким образом, неотъемлемую структурную часть тРНК, необходимую для ее функционирования.

С помощью РСА и исследований в растворе показано, что немодифицированные тРНК-транскрипты и природные тРНК имеют очень похожую пространственную структуру. Однако третичная структура транскриптов существ-

вует только в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  (4–5 мМ), независимо от ионной силы раствора, в отличие от природных тРНК, образующих компактную L-образную структуру и в отсутствие двухвалентных ионов металла [9]; последние лишь значительно стабилизируют ее (рис. 1.3). Посттранскрипционная модификация ограничивает подвижность молекулы тРНК: обмен имино-протонов в нуклеотидах, стабилизирующих третичную структуру, протекает в 20 раз медленнее в природных тРНК, чем в транскриптах.

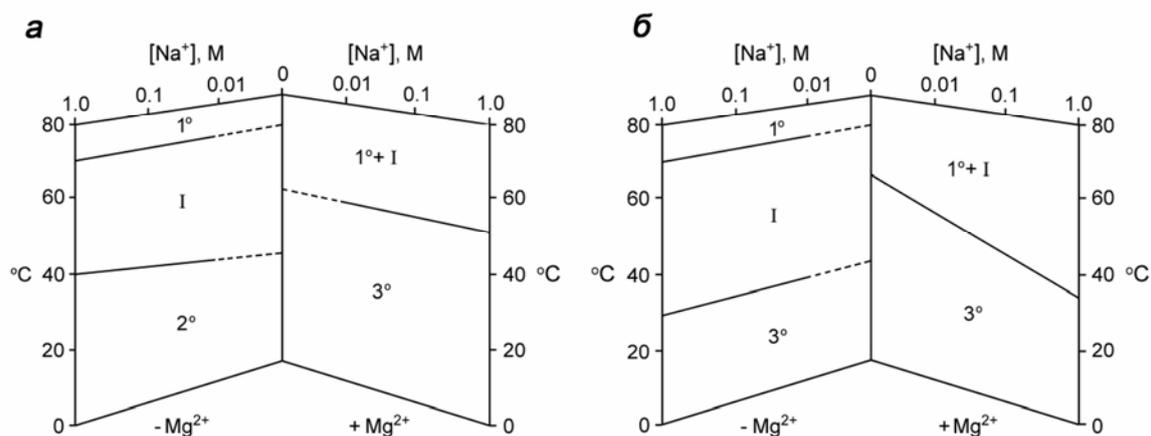


Рис. 1.3. Фазовые диаграммы по данным тепловой денатурации, описывающие конформационные состояния в растворе немодифицированной (а) и природной дрожжевой тРНК<sup>Phc</sup> (б) в зависимости от условий [9]: 1° – статистический клубок, 2° – вторичная структура, 3° – третичная структура, I – промежуточные состояния. Отсутствующие данные показаны штриховкой

### Глава 3. Два класса аминоксил-тРНК-синтетаз:

#### структурные признаки и общие характеристики взаимодействия с низкомолекулярными субстратами

Несмотря на общую роль в процессе биосинтеза белка, аминоксил-тРНК-синтетазы чрезвычайно разнообразны по размеру, последовательности и трехмерной структуре; их молекулярные массы находятся в диапазоне 37–250 кДа, а четвертичная структура варьирует от мономеров до гомо- и гетеротетрамеров. Существование взаимосвязи между различными синтетазами стало очевидным после того, как была определена структура SerRS и AspRS, оказавшихся совершенно непохожими на ранее изученные GlnRS и TyrRS [10]. Рентгеноструктурный анализ этих четырех ферментов и анализ аминокислотных последовательностей других синтетаз позволили разделить самое многочисленное семейство на два класса (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Классификация аминоксил-тРНК-синтетаз и их характеристики

Характеристика	Класс I	Класс II
Представители (субъединичный состав)	<i>Подкласс Ia</i> ArgRS ( $\alpha$ ), CysRS ( $\alpha$ ), IleRS ( $\alpha$ ), LeuRS ( $\alpha$ , $\alpha\beta$ ), ValRS ( $\alpha$ ), MetRS ( $\alpha$ , $\alpha_2$ ),	<i>Подкласс IIa</i> GlyRS ( $\alpha_2$ ), HisRS ( $\alpha_2$ ), ProRS ( $\alpha_2$ ), ThrRS ( $\alpha_2$ ), SerRS ( $\alpha_2$ )
	<i>Подкласс Ib</i> GlnRS ( $\alpha$ ), GluRS ( $\alpha$ ), LysRS1 ( $\alpha$ )	<i>Подкласс IIb</i> AsnRS ( $\alpha_2$ ), AspRS ( $\alpha_2$ ), LysRS2 ( $\alpha_2$ )
	<i>Подкласс Ic</i> TrpRS ( $\alpha_2$ ), TyrRS ( $\alpha_2$ )	<i>Подкласс IIc</i> AlaRS ( $\alpha_4$ ), GlyRS [ $(\alpha\beta)_2$ ], PheRS [ $(\alpha\beta)_2$ ], PylRS ( $\alpha_2$ ), SepRS ( $\alpha_4$ )
Консервативные мотивы*	$\phi$ N $\phi$ Gh KmSKs	мотив 1: g $\phi$ x $\phi$ x $\phi$ xP $\phi$ $\phi$ мотив 2: fR $\phi$ x $\phi$ x $\phi$ <sub>n=4-12</sub> (h/r)xxxFxxx(d/e) мотив 3: g $\phi$ g $\phi$ g $\phi$ (d/e)R $\phi$ $\phi$ $\phi$ $\phi$ $\phi$
Топология активного центра	параллельный $\beta$ -слой (укладка Россмана)	антипараллельный $\beta$ -слой, фланкируемый спиралями
Позиционная специфичность	2'-ОН-группа	3'-ОН-группа (исключение PheRS)

\* Консервативные аминокислотные остатки обозначены большими буквами (в соответствии с принятым однобуквенным кодом аминокислот), строго консервативные остатки выделены жирным шрифтом;  $\phi$  – гидрофобный остаток; x – любой остаток;  $x_{n=4-12}$  – цепь переменной длины в мотиве 2, образующая петлю

Каждый класс содержит по 10 ферментов, специфичных к стандартным аминокислотам. Исключением является существование в разных организмах двух типов LysRS со структурной топологией классов I и II. Синтетазы, специ-

фичные к нестандартным аминокислотам пирролизину и фосфосерину, отнесены к классу II. Деление на подклассы основано на структурном сходстве не только активных центров, но и некаталитических доменов. Все представители подклассов Ia и Ib являются мономерами, а подкласс Ic объединяет гомодимеры. Большинство ферментов класса II – гомодимеры, а некоторые представители подкласса IIc имеют более сложную четвертичную структуру (см. табл. 1.2). К 2010 г. установлена структура всех синтетаз разной специфичности в основном эубактериального происхождения; их гомологи из архебактерий и эукариот остаются менее изученными [3, 11]. Активный центр ферментов класса I построен на основе классического динуклеотидсвязывающего домена Россмана (Rossmann fold), который состоит из 5–6 параллельных  $\beta$ -цепей и содержит две консервативные (сигнальные) последовательности  $\phi H\phi Gh$  и  $KmSKs$  (рис. 1.4). Для каталитического домена синтетаз класса II характерно наличие семи антипараллельных  $\beta$ -цепей, фланкированных с двух сторон  $\alpha$ -спиралями, и консервативных мотивов 2 и 3. Мотив 1 формирует  $\alpha$ -спираль, которая участвует в образовании межсубъединичных контактов. Все мотивы класса II длиннее и разнообразнее по составу сигнальных пептидов класса I (см. табл. 1.2).

Структурное различие синтетаз проявляется в конформациях трифосфатной цепи связанной молекулы АТФ: вытянутой или изогнутой в активном центре ферментов класса I или класса II соответственно (см. рис. 1.4). Второе различие между классами состоит в способах связывания акцепторной ветви тРНК: для класса I (кроме *TyrRS* и *TrpRS*) характерны взаимодействие с акцепторным стеблем со стороны его малой бороздки и шпилькоподобная структура 3'-концевого тетра nukлеотида тРНК, а для II-ого класса (а также *TyrRS* и *TrpRS*) – связывание акцепторного стебля со стороны его большой бороздки и вытянутая конформация 3'-конца. Принадлежность к определенному классу

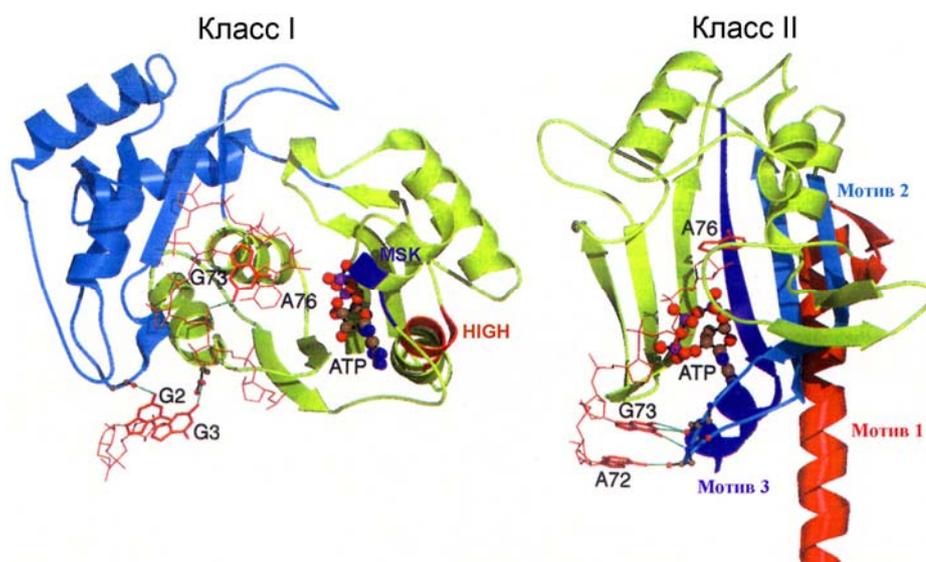


Рис. 1.4. Структура активных центров аминокислот-тРНК-синтетаз, принадлежащих классу I (*GlnRS*) и классу II (*AspRS*). Характерные структурные мотивы выделены разным цветом в соответствии с их обозначением. Показаны разные (характерные для класса) конформации молекулы АТФ и акцепторного конца специфичной тРНК в комплексах двух ферментов. Рисунок воспроизведен из обзора [10]

коррелирует с функциональными различиями синтетаз: все ферменты класса I используют 3'-концевую 2'-ОН-группу тРНК в качестве акцептора аминокислоты, а ферменты класса II (за исключением PheRS) – 3'-ОН-группу. Каждый класс имеет общие характеристики механизмов узнавания АТФ, обусловленные участием сигнальных пептидов (рис. 1.5).

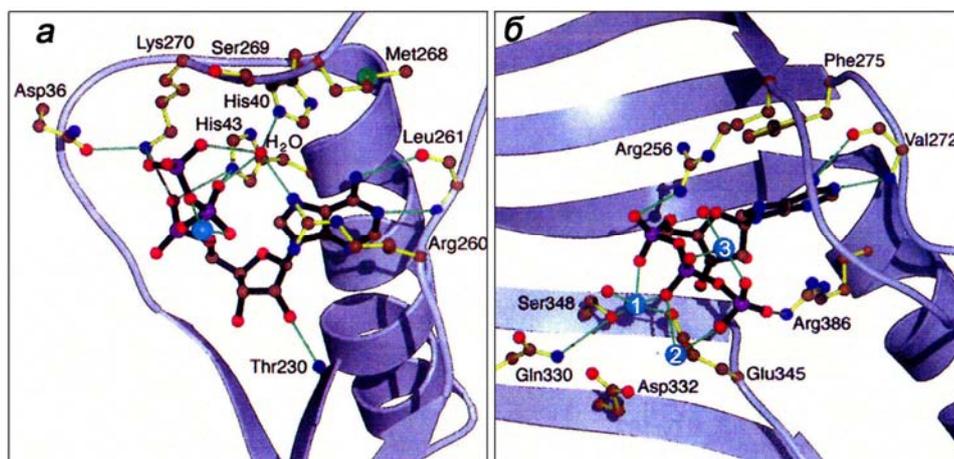


Рис. 1.5. Связывание АТФ синтетазами классов I (GlnRS, *a*) и II (SerRS, *б*). Изображены аминокислотные остатки ферментов и ионы  $Mg^{2+}$  (сферы синего цвета), взаимодействующие с субстратом (взаимодействия показаны зелеными линиями): *a* – остатки 40–43 и 256–275 принадлежат мотивам фНфGh и KmSKs соответственно; *б* – остатки 256–275 входят в состав мотива 2, а Arg386 – мотива 3; консервативные остатки Asp332, Glu345 и Ser348 участвуют в координации каталитического иона  $Mg^{2+}$  (1). Рисунок воспроизведен из обзора [10]

Экзоциклическая аминогруппа аденина связана с карбонильной группой пептидного скелета петли, несущей KmSKs-мотив, или петли мотива 2 в соответствующем классе. Стэкинг основания с боковыми группами остатков Phe (из мотива 2) и Arg (из мотива 3) дополнительно стабилизирует конформацию АТФ в комплексах с синтетазами класса II. Остаток рибозы принимает  $C_2'$ - или  $C_3'$ -эндо-конформацию в комплексе с ферментом класса I или II, которая стабилизируется своеобразной для каждого фермента сетью взаимодействий. Только образование водородной связи между 2'-гидроксилем АТФ и аминогруппой Gly (или другой небольшой аминокислоты) N-концевого фрагмента домена Россмана является общим свойством синтетаз класса I [12]. Конформация трифосфатной цепи АТФ стабилизируется ее взаимодействиями с ионами  $Mg^{2+}$  и консервативными остатками His и Lys из сигнальных пептидов фНфGh и KmSKs или двумя инвариантными (абсолютно консервативными) остатками Arg из мотивов 2 и 3. Во всех известных комплексах синтетаз класса I (кроме MetRS) присутствует один ион металла, связанный с двумя ( $\beta$ - и  $\gamma$ -) фосфатными группами АТФ, а в комплексе GluRS – со всеми тремя фосфатами. U-образная конформация трифосфатной цепи в комплексах ферментов класса II стабилизируется взаимодействиями АТФ с тремя ионами  $Mg^{2+}$ : один из них связан с  $\alpha$ - и  $\beta$ -фосфатами, два других – с  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатами. Исключениями являются три фермента подкласса IIa, в которых функцию первого иона  $Mg^{2+}$  выполняет консер-

вативный аминокислотный остаток: Arg в HisRS, Lys в ThrRS и His в ProRS. В связывании ионов  $Mg^{2+}$  синтетазами класса II участвуют консервативные остатки Asp и Glu, число которых варьирует в зависимости от фермента. Различаются позиции прочно связанного (двумя остатками белка) иона  $Mg^{2+}$ : в комплексах GlyRS, SerRS, AsnRS и LysRS он локализован между  $\alpha$ - и  $\beta$ -фосфатами АТФ, а в комплексах разных AspRSs – между  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатами. Для стабилизации уходящей пиррофосфатной группы все ферменты класса II используют наряду с инвариантным остатком Arg из мотива 3 консервативные остатки Arg или His из мотива 2; только два фермента класса I – MetRS и TyrRS – используют дополнительно к характерным мотивам остаток Lys из других доменов.

Участки связывания аминокислот хорошо структурированы в синтетазах класса II, тогда как для класса I характерны более открытые неупорядоченные полости [10, 12]. Аминогруппа субстрата фиксируется водородными связями с консервативными аминокислотными остатками фермента. Синтетазы класса I используют для этого С-концевой остаток Asp второй  $\beta$ -цепи домена Россмана и другие остатки, консервативные в ферментах определенной специфичности. У большинства синтетаз класса II (кроме ThrRS) эту функцию выполняет консервативный мотив, содержащий остатки Thr (или Ser) и Glu. В связывании  $\alpha$ -карбоксильной группы аминокислотного субстрата участвуют, как правило, неконсервативные внутри классов остатки. Некоторые ферменты класса II используют дополнительно к ним инвариантный остаток Arg из мотива 2, который взаимодействует также с  $\alpha$ -фосфатом АТФ. Узнавание боковых групп аминокислот обеспечивается изначальной комплементарностью многих ферментов субстрату по известной модели «замка и ключа»; важная роль в распознавании истинного субстрата принадлежит стерическим эффектам и специфическим контактам. Так, в активном центре PheRS имеется глубокий «карман» для связывания фенилаланина, разные стенки которого сформированы либо малыми остатками Gly, либо гидрофобными остатками, либо заряженными и полярными остатками (рис. 1.6).

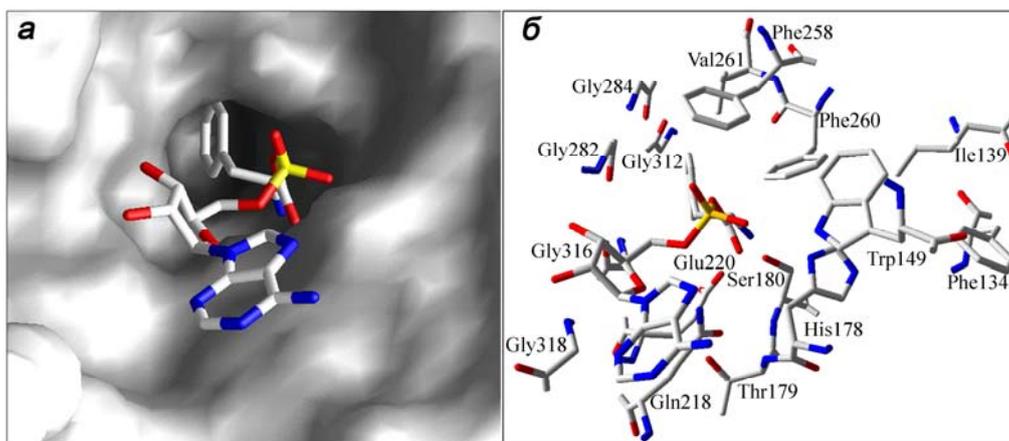


Рис. 1.6. Структура активного центра PheRS *T. thermophilus* [13]: а – поверхность белка в сайте связывания фенилаланиладенилата, комплементарная лиганду; б – остатки аминокислот, формирующие полость и ответственные за специфичность взаимодействия с фенилаланином

Такое распределение остатков в полости обеспечивает точную ориентацию боковой и основной цепей фенилаланина. Консервативные остатки Phe258 и Phe260, ароматические кольца которых ориентированы под углом  $\sim 90^\circ$  друг к другу и к кольцу молекулы субстрата, вносят главный вклад в специфичность взаимодействия (см. рис. 1.6, б).

В то же время селективность отбора аминокислот такими ферментами, как CysRS, MetRS, HisRS и ProRS, обеспечивается в основном индуцированным соответствием: взаимодействие специфичной аминокислоты с ферментом вызывает в последнем конформационные изменения, в результате которых полностью формируется участок связывания боковой группы субстрата. Избирательность некоторых синтетаз осложнена необходимостью отбора среди равных по размеру (изостеричных) и близких по структуре аминокислот. В случае CysRS и ThrRS отбраковка изостеричных аминокислот (серина и валина соответственно) обеспечивается присутствием в активном центре иона  $Zn^{2+}$ , взаимодействующего с SH- или OH-группой истинного субстрата. Недостаточный уровень дискриминации аминокислот иногда приводит к синтезу ошибочных продуктов аминоацилирования тРНК. Их участие в трансляции исключается благодаря гидролизу в «редактирующем» («proofreading» или «editing») центре синтетаз, который сформирован отдельным доменом и удален от синтезирующего центра на 30–40 Å. Гидролитическая активность и соответствующие домены обнаружены у ряда синтетаз: IleRS, LeuRS, ValRS, AlaRS, ThrRS, ProRS и PheRS. Критическая роль этой функции синтетаз в обеспечении жизнедеятельности клеток показана на примере AlaRS: мутации «корректирующего» домена фермента в патологических условиях приводят к дегенерации нейронов. Более подробно гидролитическая активность синтетаз описана в главе 5.

Механизм реакции аминоацилирования тРНК детально изучен для многих синтетаз с помощью кинетических методов, сайт-направленного мутагенеза и РСА и является общим для всего семейства. Его схематическое описание, предложенное для наиболее изученной на структурном уровне AspRS [10, 12], отражает основные принципы катализа (рис. 1.7). Обе стадии реакции аминоацилирования тРНК протекают по механизму нуклеофильного замещения  $S_N2$ -типа. На первой стадии  $\alpha$ -карбоксилат-ион аминокислоты атакует  $\alpha$ -атом фосфора АТР со стороны, противоположной уходящей пирофосфатной группе, в результате чего образуется смешанный ангидрид – аминоациладенилат. Взаимодействия ионов магния и положительно заряженных аминокислотных остатков из характерных структурных мотивов с  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатами АТР нейтрализуют отрицательный заряд уходящей пирофосфатной группы и активируют гидролиз  $\alpha$ - $\beta$ -межфосфатной связи. Аналогичные взаимодействия с  $\alpha$ -фосфатом увеличивают электрофильность атакуемого атома фосфора и стабилизируют переходное состояние реакции активации. На следующей стадии 2'-ОН-группа (или 3'-ОН, в зависимости от фермента) 3'-концевого аденозина тРНК атакует карбонильную группу аминоациладенилата с образованием сложного эфира – аминоацил-тРНК – и уходом АМР. Атакующая гидроксильная группа образует водородную связь с фосфатом аденилата, что увеличивает её нуклеофильность. Аминокислотные остатки, взаимодействующие с  $\alpha$ -фосфатом и карбонильной

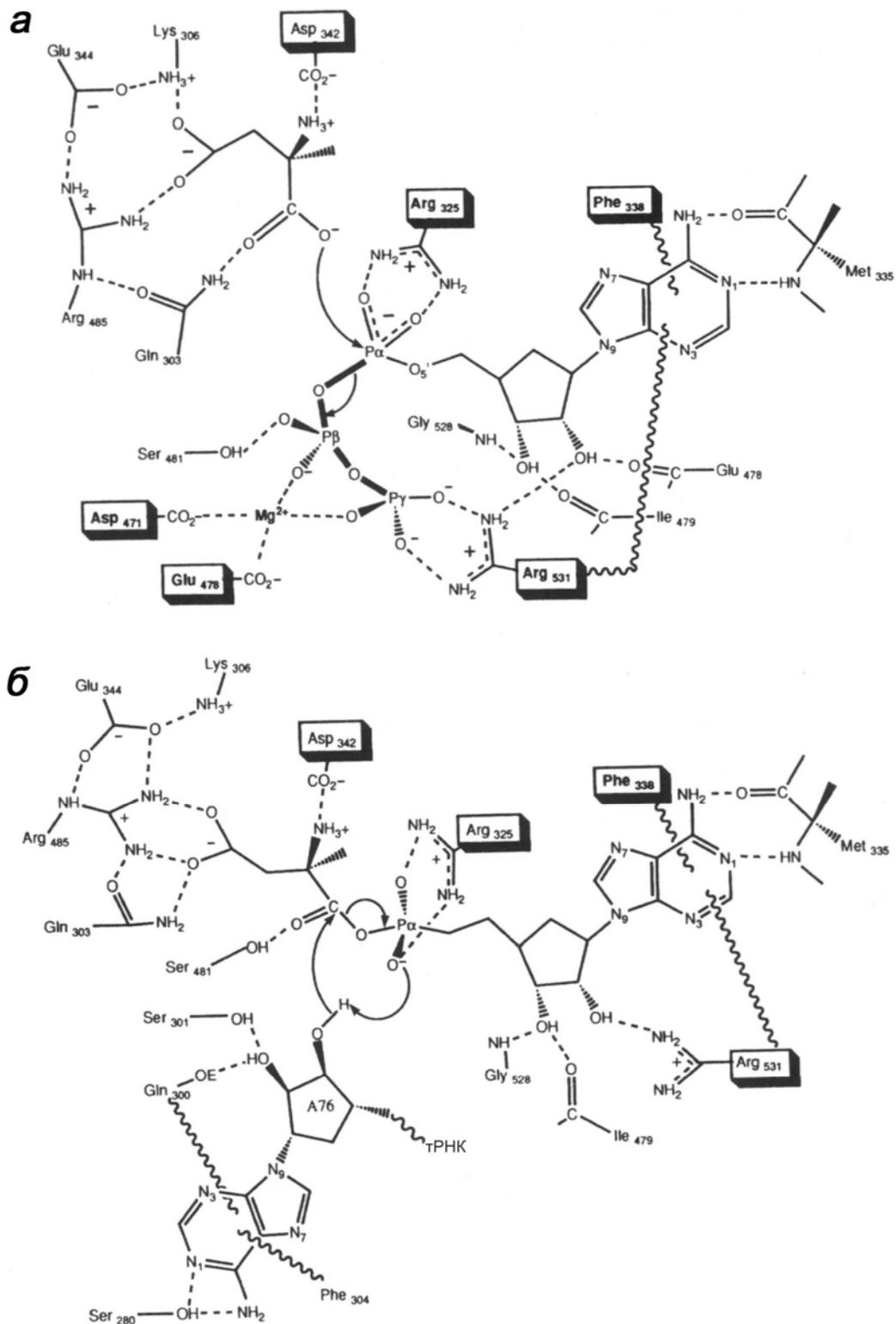


Рис. 1.7. Схема взаимодействий в активном центре дрожжевой AspRS, ответственных за каталитические превращения субстратов на первой стадии синтеза аспартиладенилата (*a*) и на стадии переноса активированного остатка Asp на 3'-концевой аденозин (A76) тРНК<sup>Asp</sup> (*b*). В рамках остатки аминокислот, консервативные в синтетазах класса II

группой аденилата, увеличивают электрофильность последней и стабилизируют циклический интермедиат. Каталитическая функция синтетаз состоит в правильном размещении субстратов с подходящей ориентацией реагирующих групп и стабилизации переходных состояний двух стадий реакции. Степень участия характерных структурных мотивов в катализе сильно варьирует, особенно среди ферментов класса I. Так, в связывании  $\alpha$ -фосфата участвует второй остаток His из  $\phi H\phi Gh$ -мотива в IleRS, ValRS, MetRS и GluRS (где он заменен на Thr), второй остаток Lys из KmSKs-мотива в TrpRS, оба остатка из двух мотивов в GlnRS, и не участвует ни один из сигнальных мотивов в TyrRS. Первый остаток Lys из KmSKs-мотива отсутствует в GlnRS, и его функцию в стабилизации переходного состояния реакции переноса активированной аминокислоты на тРНК выполняет не принадлежащий этому мотиву остаток Arg, консервативный только в GlnRS.

Для большинства синтетаз взаимодействие с низкомолекулярными субстратами – аминокислотой и АТФ – и синтез аминокиладенилата не требуют присутствия тРНК. Четыре фермента класса I – ArgRS, GlnRS, GluRS и LysRS1 – не катализируют первую стадию в отсутствие специфичной тРНК и известны как *тРНК-зависимые синтетазы*. Структурный анализ комплексов GlnRS с субстратами показал, что концевой аденозин тРНК<sup>Gln</sup> формирует участок связывания L-глутамина, индуцируя локальные перестройки в активном центре [3, 12]. Взаимодействие GluRS с тРНК<sup>Glu</sup> является необходимым условием не только для формирования комплементарного сайта связывания L-глутаминовой кислоты, но и для продуктивного взаимодействия с АТФ: в отсутствие тРНК<sup>Glu</sup> молекула АТФ связывается таким образом, что ее  $\alpha$ -фосфат слишком удален от атакующей  $\alpha$ -карбоксильной группы аминокислотного субстрата.

Что лежит в основе деления синтетаз на два структурно не связанных класса? Согласно одной гипотезе, два класса могут быть кодированы комплементарными цепями ДНК [11]. Эта гипотеза основана на кажущейся симметрии распределения 20 синтетаз по двум классам и связывании ими противоположных сторон акцепторного стебля тРНК. Согласно другой гипотезе, два класса возникли независимо и уходят корнями в древние аппараты трансляции. Ферменты класса II являются, по-видимому, более древними, чем ферменты класса I, поскольку ацилируют тРНК в основном более простыми и малыми по размеру аминокислотами, которые играют решающую роль в формировании трехмерной укладки белков. Более того, аминокислоты, служащие субстратами синтетаз класса II, чаще кодируются триплетами, связанными с более древними генами. В пользу более древнего происхождения этих аминокислот свидетельствуют также короткие пути их биосинтеза. На глубокую эволюционную связь между аминокислотированием тРНК и биосинтезом аминокислот указывает структурное сходство между каталитическими доменами аминокислот-тРНК-синтетаз и ферментов, вовлеченных в биосинтез аминокислот.

## Глава 4. Взаимодействие аминоктил-тРНК-синтетаз и тРНК.

### Проблема узнавания

#### 4.1. Элементы специфичности в тРНК и методы их определения

Взаимодействие синтетаз с тРНК является примером высокоспецифичного белково-нуклеинового узнавания. Проблема «узнавания» тРНК как нахождения структурных элементов тРНК, по которым каждый фермент отличает «свою» тРНК от «чужих», была сформулирована вскоре после открытия этих молекул (в начале 60-х годов прошлого столетия) и имеет многолетнюю историю. Решение этой сложной фундаментальной проблемы значительно продвинулось благодаря разработке функциональных методов, основанных на применении мутантных генов тРНК, а также рентгеноструктурным исследованиям синтетаз и тРНК, начиная с 1989 г. Результаты большинства работ, выполненных за последние два десятилетия, обобщены в обзорах [3, 7, 8, 11].

Самые многочисленные исследования по механизмам узнавания тРНК синтетазами выполнены с помощью двух функциональных тестов: генетических методов *in vivo* и кинетических экспериментов *in vitro* с мутантными тРНК. К элементам (детерминантам) специфичности, которые называют, как правило, элементами идентичности («identity elements») в экспериментах *in vivo* или элементами узнавания («recognition elements») в исследованиях *in vitro*, относят нуклеотиды тРНК, замена которых приводит к потере специфичности или эффективности аминоктирования. Наиболее часто применяемый подход *in vivo* основан на использовании мутантных генов супрессорной тРНК, полученной введением стоп-антикодона (CUA или UCA) в тестируемую тРНК. Мутантные гены клонируются в экспрессирующие векторы, и исследуется способность супрессорных тРНК подавлять стоп-кодон в гене репортерного белка, экспрессируемого в *E. coli*. Специфичность мутантных форм тРНК определяется путем анализа аминокислот, встроенных в транслируемый белок. Эти эксперименты проводятся в физиологических условиях, когда присутствуют все специфичные к разным аминокислотам aaRSs и конкурируют за взаимодействие с данной тРНК. Примеры определения специфичности аминоктирования некоторых мутантных тРНК, содержащих amber-антикодон (CUA), представлены в табл. 1.3. Потеря специфичности оценивалась по относительному включению аминокислот в рекомбинантную дегидрофолатредуктазу, в соответствующую amber-кодону позицию. Частота включения правильной аминокислоты варьирует в диапазоне от 0 до 100 %. Значительные эффекты (> 90 % включения неправильных аминокислот), обусловленные, например, заменой в супрессорной тРНК<sup>Arg</sup> *E. coli* аденозина в позиции 20 на уридин (A20U), приводят к полной потере природной специфичности, и A20 является основным элементом идентичности тРНК<sup>Arg</sup>. Наблюдаемое для супрессорной тРНК<sup>Arg</sup> дикого типа ошибочное включение Lys объясняется заменой C35 в антикодоне тРНК<sup>Arg</sup> на U35, соответствующий элементу идентичности тРНК<sup>Lys</sup>. Множественная специфичность – включение разных аминокислот в одну тРНК – общее свойство мутантных супрессорных тРНК, обусловленное как удалением элементов идентич-

Примеры исследований специфичности аминоацилирования *in vivo*

тРНК <i>E. coli</i>	Мутации	Включение аминокислоты, %	
		правильная	неправильные
тРНК <sup>Arg</sup> (amber)	(amber-антикодон)	Arg (37 %)	Lys (55 %)
тРНК <sup>Arg</sup> (amber)	A20→U20	Arg (0 %)	Lys (91 %)
тРНК <sup>Arg</sup> (amber)	A59→U59	Arg (38 %)	Lys (50 %)
тРНК <sup>Cys</sup> (amber)	U73→A73	Cys (0 %)	Lys (63 %); Tyr (20 %); Gln (8 %)
тРНК <sup>Cys</sup> (amber)	A31-U39→C31-G39	Cys (90 %)	Gln (10 %)
тРНК <sup>Cys</sup> (amber)	G29-C41→U29-A41	Cys (93 %)	Gln (5 %)
тРНК <sup>Cys</sup> (amber)	G27-U43→C27-G43	Cys (89 %)	Gln (11 %)

ности данной пары aaRS-тРНК, так и внесением элементов идентичности других пар. Для исследования роли антикодона разработан альтернативный метод *in vivo*, основанный на применении инициаторных тРНК [8]; его ограничением является наличие определенной структуры акцепторного стебля, необходимой для формилирования аминоацил-тРНК. Для отбора функционально активных тРНК *in vivo* из огромного набора мутантов, содержащих замены в различных районах, предложен еще один подход, который основан на конструировании клеточных штаммов, инактивированных отсутствием гена тРНК данной специфичности [14].

Абсолютно другая стратегия используется для определения элементов узнавания *in vitro*: вместо оценки влияния мутаций тРНК на биосинтез белка определяются их физико-химические эффекты в реакции аминоацилирования путем измерения кинетических параметров (константы Михаэлиса  $K_m$  и числа оборотов  $k_{cat}$ ) для тРНК-транскриптов и их мутантных форм. Уменьшение в результате мутации параметра  $k_{cat}/K_m$  (называемого каталитической эффективностью, или константой специфичности) служит мерой потери специфичности. тРНК получают транскрипцией синтетической ДНК-матрицы с помощью Т7 РНК-полимеразы. Отсутствие модифицированных оснований в транскриптах почти не влияет на эффективность их аминоацилирования по сравнению с природными тРНК, как показано для большинства систем. Некоторым ограничением в применении синтезированных *in vitro* тРНК является обязательное присутствие гуанозина на 5'-конце для эффективной транскрипции. Однако использование динуклеотида NpG для инициации транскрипции позволяет включать любой нуклеозид в 5'-конец тРНК. Чтобы оценить вклад посттранскрипционной модификации тРНК в специфичность, молекулы тРНК с минорными остатками в определенных позициях синтезируют химически. Кинетические измерения уровня аминоацилирования тРНК проводят путем включения радиоактивно меченой аминокислоты в тРНК и осаждения аминоацил-тРНК трихлоруксусной кислотой на фильтрах. Другой метод основан на разделении аминоацилированной и свободной тРНК (<sup>32</sup>P-меченых) с помощью гель-электрофореза в кислых

условиях. Эксперименты *in vitro* выполняются с индивидуальными ферментами и тРНК в отсутствие других синтетаз и, следовательно, не в физиологических условиях. Несмотря на эти ограничения, они позволяют количественно оценить вклад каждого элемента тРНК в эффективность ее узнавания «своим» ферментом. Для подтверждения полноты набора элементов узнавания тРНК соответствующей синтетазой проводятся эксперименты по переключению специфичности: трансплантация такого набора в «чужие» тРНК делает их эффективными субстратами данного фермента. Определяемые с помощью различных подходов элементы специфичности могут быть неидентичными, поскольку эксперименты *in vivo* отражают влияние мутаций на взаимодействие тРНК не только со специфичной aaRS, но и с другими конкурирующими синтетазами и белками аппарата трансляции. Использование взаимодополняющих подходов *in vivo* и *in vitro* позволяет выявить полный набор элементов специфичности исследуемой тРНК: важные для узнавания своей aaRS положительные элементы (детерминанты) и предотвращающие взаимодействие с неспецифичными синтетазами отрицательные элементы (антидетерминанты).

С помощью описанных методов установлены элементы узнавания тРНК для всех 20-ти синтетаз из *E. coli*, 15-ти из дрожжей и некоторых синтетаз из термофильной бактерии *T. thermophilus* или других эубактерий, а также из археобактерий и высших эукариот, включая человека (табл. 1.4). Для большинства тРНК *E. coli* выявлены полные наборы элементов специфичности. Анализ данных показал, что относительно небольшое число нуклеотидов в тРНК является критическим для специфичности аминокислотирования, и этот набор строго индивидуален для каждой пары aaRS-тРНК.

На рис. 1.8 представлено распределение элементов узнавания в тРНК *E. coli* для всех синтетаз, сгруппированных в соответствии с их принадлежностью к классам. В обеих группах элементы расположены преимущественно в двух периферических районах тРНК: антикодоне и акцепторной ветви. Гипотеза о решающей роли антикодона тРНК в избирательном взаимодействии с aaRS, высказанная отечественными учеными на ранних этапах изучения этой проблемы [1], нашла блестящее подтверждение: нуклеотиды антикодона вносят основной вклад в специфичность большинства изученных систем (см. табл. 1.4). Позиция 35 всегда важна для узнавания; нуклеотиды в позициях 34 (варьирующие в изоакцепторных тРНК) и 36 выполняют эту функцию реже либо с меньшим вкладом. Взаимодействие антикодона некоторых тРНК с синтетазами показано и другими биохимическими экспериментами. Так, ValRS, IleRS, MetRS, CysRS, TyrRS, HisRS и ThrRS *E. coli*, LysRS *B. burgdorferi*, TyrRS и PheRS *T. thermophilus* и дрожжевые ArgRS, AspRS и PheRS защищают при взаимодействии со специфичной тРНК антикодон от гидролиза эндонуклеазами или модификации химическими реагентами [2, 3]. В антикодонной петле некоторых тРНК обнаружены дополнительные к антикодону элементы узнавания (см. табл. 1.4); для специфичности дрожжевой тРНК<sup>Met</sup> важна последовательность всей петли.

Элементы узнавания тРНК аминоксил-тРНК-синтетазы класса I и II<sup>a</sup>

I	Организм	Акцепторная ветвь	Антикодонавая ветвь	Другие районы тРНК
Arg	<i>E. coli</i>	A/G73 <sup>6</sup>	C35, G/U36 <sup>6</sup>	A20
	<i>T. thermophilus</i>		C35	A20
	<i>S. cerevisiae</i>		C35, G/U36 <sup>6</sup>	
	млекопит.		C35, U27-G43 <sup>B</sup>	A20, G49-U65 <sup>B</sup>
Val	<i>E. coli</i>	A73, G3-C70 <sup>B</sup> , U4-A69 <sup>B</sup>	A35, C36	G20 <sup>B</sup> , G45 <sup>B</sup>
	<i>T. thermophilus</i>	A73	A35 <sup>r</sup> , C36 <sup>r</sup>	G18, G19-C56
	<i>S. cerevisiae</i>		A35	
Ile	<i>E. coli</i>	A73, C4-G69	L/G34 <sup>6</sup> , A35, U36, t <sup>6</sup> A37, A38, C29-G41	U12-A23
	<i>S. cerevisiae</i>		I/Ψ34 <sup>6</sup> , A35, U36	
Leu	<i>E. coli</i>	A73		U8-A14, A15-U48, G18-U55, G19-C56, U54-A58, A20a, G47j
	<i>S. cerevisiae</i>	A73	A35, G37	
	<i>H. sapiens</i>	A73, C3-G70, A4-U69, G5-C68		G18, G19, C20a, V-ветвь (д., п.) <sup>d</sup>
	<i>H. volcanii</i>	A73		A20b, A47c, G47d, U47h, V-ветвь (д.) <sup>d</sup>
Met fMet	<i>E. coli</i>	A73, U4-A69, A5-U68, (G2-C71, C3-G70) <sup>e</sup>	C34, A35, U36 (C32, U33, A37) <sup>e</sup>	
	<i>S. cerevisiae</i>	A73	C32, U33, C34, A35, U36, A37, A38	D-ветвь <sup>ж</sup>
	<i>H. volcanii</i>	н. и. <sup>3</sup>	C34, A35, U36	н. и. <sup>3</sup>
Cys	<i>E. coli</i>	U73, G2-C71, C3-G70	G34, C35, A36	U21, Δ47 <sup>n</sup> , G15-G48, A13-A22-A46
	<i>H. influenzae</i>	U73	G34, C35, A36	G15-G48, A13-A22, A9, A46
	<i>S. cerevisiae</i>	U73	G34, C35, A36	
	<i>H. sapiens</i>	U73	G34, C35, A36	A13-A22
	<i>Halobacterium NRC-1</i>	U73	G34, C35, A36	
Glu	<i>E. coli</i>	G1-C72, U2-A71	mm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U34, U35, A37	Δ47 <sup>n</sup> , U11-A24, U13-G22-A46
Gln	<i>E. coli</i>	G73, U1-A72, G2-C71, G3-C70, G4-C69, G5-C68	U/C34 <sup>6</sup> , U35, G36, A37, U32-U38	C9, G10-C25, C11-G24, A13-A22, G15-C48
Tyr	<i>E. coli</i>	A73, G1-C72 <sup>B</sup>	G34 <sup>B</sup> , U35	V-ветвь (д.) <sup>d</sup>
	<i>S. cerevisiae</i>	A73, C1-G72	G34, Ψ35, A36	
	<i>H. sapiens</i>	C1-G72	galQ34	н. и. <sup>3</sup>
	<i>M. jannaschii</i>	A73, C1-G72	G34, U35 <sup>B</sup> , A36 <sup>B</sup>	
	<i>A. pernix</i>	A73, C1-G72	G34, U35	
Trp	<i>E. coli</i>	G73, A1-U72, G2-C71, C3-G70	C34, C35, A36	
	<i>B. subtilis</i>	G73, A1-U72 <sup>B</sup> , G2-C71, C3-G70, G4-C69, G5-C68 <sup>B</sup>	C34, C35, A36	A9 <sup>B</sup>
	<i>S. cerevisiae</i>	A73	C34, C35	
	<i>A. thaliana</i>	A73	C34, C35, A36	

Таблица 1.4 (продолжение)

<b>Lys I</b>	<i>B. burgdorferi</i>	A73, G2-U71, G3-C70	<b>U35, U36</b>	
	<i>M. maripaludis</i>	A73	U36	
<b>II</b>	Организм	Акцепторная ветвь	Антикодоновая ветвь	Другие районы тРНК
<b>Ser</b>	<i>E. coli</i>	<b>G73, G1-C72, G2-C71, A3-U70</b>		V-ветвь (д.) <sup>д</sup> , C11-G24, D-петля <sup>к</sup>
	<i>S. cerevisiae</i>	акцепторный стебель <sup>ж</sup>		V-ветвь (д., п.) <sup>д</sup>
	<i>H. sapiens</i> , млекопит.	G73		V-ветвь (д., п.) <sup>д</sup>
	<i>M. barkeri</i>	G73, G1-C72	G30-C40	V-ветвь (д.) <sup>д</sup> , G46
<b>Thr</b>	<i>E. coli</i>	G1-C72, C2-G71	G35, U36	
	<i>T. thermophilus</i>	U73, G1-C72, U3-A70	G35, U36	
	<i>S. cerevisiae</i>	G1-C72	G35, U36	
	<i>A. pernix</i>	G1-C72, C2-G71, C3-G70	G35, U36	
	<i>H. volcanii</i>	U73, G1-C72, C2-G71	G35, U36	
<b>Pro</b>	<i>E. coli</i>	A73, G72	G35, G36	G17a, G15-C48, G49, D-стебель <sup>ж</sup>
	<i>H. sapiens</i>	C73 <sup>б</sup>	G35, G36	
	<i>M. jannaschii</i>	A73, C72	G35, G36	
	<i>A. pernix</i>	A73, G1-C72	G35, G36	
<b>Gly</b>	<i>E. coli</i>	<b>U73, G1-C72, C2-G71, G3-C70</b>	<b>C35, C36</b>	
	<i>T. thermophilus</i>	G1-C72, C2-G71, G3-C70	C35, C36	G10, U16, C50-G64
	<i>S. cerevisiae</i>	A73, C2-G71, G3-C70	C35, C36	
<b>His</b>	<i>E. coli</i>	<b>C73, (5'p)G1</b>	G34 <sup>б</sup> , U35 <sup>б</sup> , G36 <sup>б</sup>	
	<i>S. cerevisiae</i>	A73, (5'p)G1	G34, U35	
<b>Asp</b>	<i>E. coli</i>	G73, G1-C72, G2-C71	G34, U35, C36, C38	G10
	<i>T. thermophilus</i>	G73	G34, U35, C36, C38	G10
	<i>S. cerevisiae</i>	G73	G34, U35, C36, C38	G10-U25
<b>Lys</b>	<i>E. coli</i>	<b>A73</b>	<u>mm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U34, U35, U36, A31-U39</u>	
	<i>H. sapiens</i>		U35, U36	U8-A14, G15-C48
<b>Asn</b>	<i>E. coli</i>	G73	G34, U35, U36	н. и. <sup>3</sup>
<b>Phe</b>	<i>E. coli</i>	<b>A73</b>	<b>G34, A35, A36, G27-C43, G28-C42</b>	<b>U20, A26-G44, U45, U59, U60</b>
	<i>T. thermophilus</i>	A73	G34, A35, A36	U20, U45-G10-C25, G19-C56; A26-G44
	<i>S. cerevisiae</i>	A73	G34, A35, A36	G20
	<i>H. sapiens</i>	A73	G34, A35, A36, G30-C40, A31-U39	G20
<b>Ala</b>	<i>E. coli</i>	A73, G1-C72, <b>G2-C71, G3-U70, G4-C69</b>		G20
	<i>S. cerevisiae, B. mori, H. sapiens, A. thaliana</i>	G3-U70		н. и. <sup>3</sup>

<sup>а</sup> Данные обзора [3]. Элементы, идентифицированные в экспериментах *in vitro*, отмечены обычным шрифтом, *in vivo* – курсивом, с использованием двух методов – полужирным шрифтом; подчеркнуты минорные нуклеотиды, являющиеся элементами специфичности.

<sup>б</sup> В указанной позиции два основания могут быть элементами специфичности.

<sup>в</sup> Слабая детерминанта.

<sup>г</sup> Данные получены с помощью РСА.

<sup>д</sup> Для специфичности важны длина (д.) или последовательность (п.) V-ветви.

<sup>е</sup> В скобках указаны элементы, дополнительно необходимые для узнавания инициаторной тРНК<sup>fMet</sup>. Пары U4-A69, A5-U68 – элементы узнавания тРНК<sup>Met</sup>.

<sup>ж</sup> Позиции элементов узнавания не идентифицированы.

<sup>з</sup> Район не исследован.

<sup>и</sup> Отсутствие 47-го нуклеотида ( $\Delta 47$ ), влияющее на стабильность третичного взаимодействия нуклеотидов U13-G22-A46, рассматривается как детерминанта специфичности.

<sup>к</sup> Число дополнительных нуклеотидов в позиции 20 критично для отбраковки тРНК<sup>Leu</sup> и тРНК<sup>Tyr</sup>.

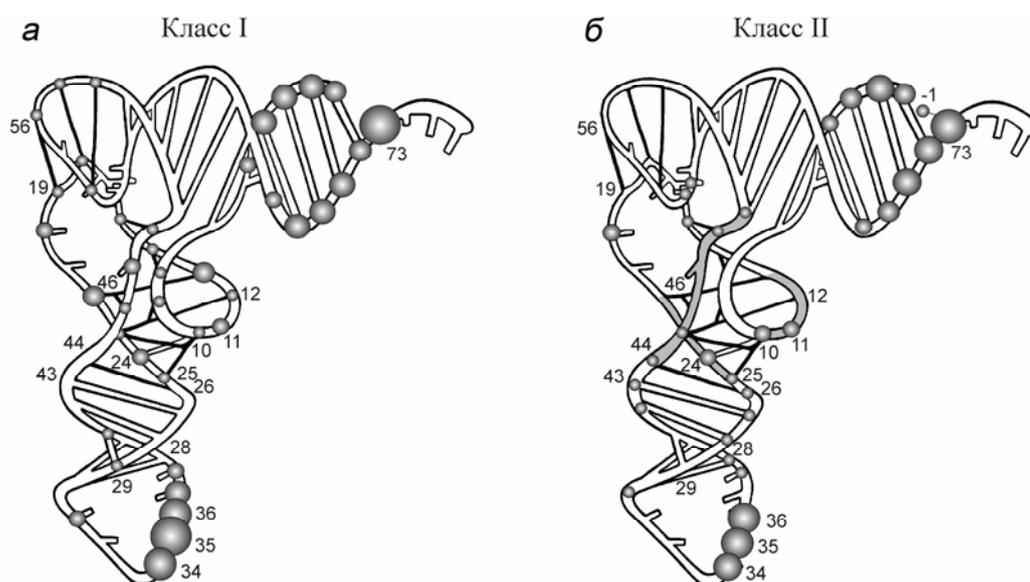


Рис. 1.8. Распределение элементов узнавания тРНК *E. coli* аминоксил-тРНК-синтетазами класса I (а) и класса II (б) в трехмерной модели. Размеры сфер пропорциональны частоте встречаемости элемента узнавания разных тРНК в данном положении. Выделенная серым цветом вариабельная ветвь узнается как структурная особенность тРНК<sup>Tyr</sup> и тРНК<sup>Ser</sup> (где размер ветви увеличен до 13 и 16–21 звеньев соответственно). Данные воспроизведены из обзора [3]

Антикодон не важен для узнавания тРНК *E. coli*, специфичных к Leu, Ser и Ala (см. табл. 1.4). Это неудивительно в случае тРНК<sup>Ser</sup>, существующей в форме шести изоакцепторов, в которых все три нуклеотида антикодона варьируют; элементы узнавания тРНК<sup>Ser</sup> находятся в D-, акцепторной и длинной вариабельной ветвях. Для Leu-специфичных пар характерны самые значительные видовые различия в требованиях к антикодону: лишь дрожжевая тРНК<sup>Leu</sup> содержит элементы узнавания в антикодонной петле. Последовательность и(или) размеры длинной V-ветви тРНК<sup>Leu</sup> важны для узнавания LeuRSs архебактерии *H. volcanii* и человека, но не определяют специфичности в *E. coli* и дрожжах. Уникальная «wobble»-пара G3-U70 тРНК<sup>Ala</sup>, сохраняющаяся в процессе эволюции, – главный элемент узнавания, трансплантация которого в другие тРНК обеспечивает их аминокислотирование аланином.

В ранних работах [15] предполагалось, что определяющую роль в реакции аминокислотирования может играть акцепторная ветвь тРНК вследствие ее близости к активному центру фермента, а нуклеотид в позиции 73 служит первичным сайтом узнавания – дискриминаторным основанием. Исследования действительно показали, что природа этого нуклеотида важна для идентичности 18-ти тРНК-синтетазных пар *E. coli* (за исключением Glu- и Thr-специфичных) и большинства изученных дрожжевых и археобактериальных систем аминокислотирования (см. табл. 1.4). Интересно отметить, что дискриминаторные основания в Trp-, Pro-, Gly- и His-специфичных тРНК различаются для эубактерий и эукариот (а также близких к ним по гомологии синтетаз археобактерий). Уникальный нуклеотид G<sup>-1</sup> на 5'-конце тРНК<sup>His</sup>, спаренный с дискриминаторным основанием, узнается бактериальными и эукариотическими HisRSs. Наличие элементов узнавания среди первых четырех нуклеотидных пар акцепторного стебля характерно для многих тРНК, но не является универсальным свойством. Акцепторный стебель тРНК<sup>Ala</sup> *E. coli*, для которой получены самые многочисленные (иногда противоречивые) данные, узнается, согласно последним данным, как целый структурный фрагмент, отдельные нуклеотиды которого вносят неодинаковый вклад в специфичность.

Элементы узнавания в центральных районах молекулы тРНК (позициях 8–31, 39–65) сильно различаются по положению и общему числу для разных тРНК (см. табл. 1.4, рис. 1.8). Нуклеотиды в антикодонном стебле узнаются лишь 5-ю ферментами из числа изученных. D-ветвь содержит чаще элементы узнавания среди спаренных нуклеотидов, чем в петле. Многие элементы специфичности в вариабельной, D- и T-ветвях вовлечены в третичные взаимодействия тРНК, обеспечивающие оптимальную для взаимодействия с ферментом трехмерную структуру субстрата. Пространственная укладка тРНК зависит не только от природы отдельных нуклеотидов, но и от длины V-ветви и от структурных параметров D-петли – числа звеньев до и после консервативных нуклеотидов G18 и G19. Необычная третичная пара G15-G48 в эубактериальных тРНК<sup>Cys</sup> и длинная V-ветвь в некоторых тРНК<sup>Leu</sup>, эубактериальных тРНК<sup>Tyr</sup> и всех тРНК<sup>Ser</sup> узнаются как структурные особенности соответствующих тРНК.

Минорные компоненты природных тРНК редко выступают в роли элементов идентичности. Так, инозин и лизидин (модифицированный U) в 34-й позиции тРНК<sup>Ile</sup> дрожжей и *E. coli* узнаются специфичными ферментами. В некоторых тРНК модификации оснований предотвращают взаимодействие с неспецифичными aaRSs (табл. 1.5, по данным обзора [3]). Лизидин в тРНК<sup>Ile</sup> *E. coli* и m<sup>1</sup>G37 в тРНК<sup>Asp</sup> дрожжей блокируют ошибочное аминокислотирование MetRS и ArgRS соответственно. Такие отрицательные детерминанты выявлены в ряде тРНК против неспецифичных синтетаз из того же источника или против специфичных синтетаз другого происхождения; в их число входят и немодифицированные нуклеотиды. Скорее всего, каждая тРНК имеет антидетерминанты против неродственных aaRSs для обеспечения необходимой специфичности *in vivo*.

## Примеры антидетерминант узнавания в парах тРНК-aaRS

Антидетерминанта	тРНК (организм)/класс	AaRS (организм)/класс
G3-U70	тРНК <sup>Ala</sup> (дрожжи)/II	ThrRS (дрожжи)/II
U34	тРНК <sup>Ile</sup> (дрожжи)/I	MetRS (дрожжи)/I
L34	тРНК <sup>Ile</sup> ( <i>E. coli</i> )/I	MetRS ( <i>E. coli</i> )/I
U30-G40	тРНК <sup>Ile</sup> (дрожжи)/I	GlnRS (дрожжи)/I; LysRS (дрожжи)/II
A36	тРНК <sup>Arg</sup> ( <i>E. coli</i> )/I	TrpRS ( <i>E. coli</i> )/I
C6-G67	тРНК <sub>2</sub> <sup>Arg</sup> (дрожжи)/I	AspRS (дрожжи)/II
m <sup>1</sup> G37	тРНК <sup>Asp</sup> (дрожжи)/II	ArgRS (дрожжи)/I
G37	тРНК <sup>Ser</sup> (дрожжи)/II	LeuRS (дрожжи)/I
A73	тРНК <sup>Leu</sup> (человек)/I	SerRS (дрожжи)/II
U28-A42 и A37	тРНК <sup>Trp</sup> (дрожжи) <sup>F</sup> /I	TrpRS (млекопитающие)/I
G2-U71	тРНК <sup>Lys</sup> ( <i>B. burgdorferi</i> )/I	LysRS ( <i>E. coli</i> )/II
G37	тРНК <sup>Cys</sup> (человек)/I	CysRS ( <i>E. coli</i> )/I

В исследованиях *in vitro* оценивают потерю кинетической специфичности ( $L$ , от англ. loss) в результате мутаций как отношение величины  $k_{cat}/K_m$  для тРНК дикого типа к соответствующему значению для мутанта. Величина  $L$  может изменяться от слабых ( $L < 10$ ) до значительных ( $L > 1000$ ) эффектов. Вклад в узнавание сильно отличается как для разных элементов, так и для разных тРНК. Обычно вклад элементов узнавания в специфичность максимален, когда их количество мало. Сила эффектов мутаций зависит от экспериментальных условий реакции аминокислотирования: концентраций ионов магния и низкомолекулярных субстратов. Этот факт необходимо учитывать при сравнении данных для различных систем, так как во многих работах отсутствуют сведения об оптимальности использованных условий. Замена элементов узнавания может оказывать влияние на каталитическую эффективность тремя способами: за счет преимущественного изменения параметра  $k_{cat}$  или параметра  $K_m$ , или обеих величин. Относительные вклады величин  $k_{cat}$  и  $K_m$  в кинетическую специфичность отличаются для разных элементов. Наибольшие эффекты за счет изменения  $k_{cat}$  и влияния на катализ реакции проявляются обычно для прямых элементов узнавания – нуклеотидов, образующих специфические (с участием оснований) контакты с ферментом. Мутации элементов, ответственных за формирование правильной общей структуры тРНК, чаще вызывают изменение величин  $K_m$ . Так, замена в дрожжевой тРНК<sup>Asp</sup> пары G10-U25 на пару A10-U25 приводит к  $K_m$ -зависимому снижению эффективности аминокислотирования. Оба нуклеотида не образуют каких-либо контактов с AspRS; не прямое участие пары в обеспечении специфичности может быть объяснено созданием локальной конформации D-стебля и его ориентации относительно антикодоновой петли, которые необходимы для взаимодействия с ферментом.

Аминоацилирование тРНК – это сложный многостадийный процесс (см. схему реакции в главе 1 и рис. 1.7); он включает первоначальное связывание синтетазами трех субстратов, конформационную перестройку комплексов, две химические реакции в активном центре и освобождение трех разных продуктов. Для окончательного ответа на вопрос о том, какова роль элементов узнавания тРНК в обеспечении специфичности аминоацилирования, требуются независимые измерения эффектов мутаций на истинные термодинамические и кинетические характеристики отдельных стадий, каковыми не являются традиционно измеряемые параметры  $k_{cat}$  и  $K_m$  реакции аминоацилирования.

Сам процесс комплексообразования аминоксил-тРНК-синтетаз с тРНК, как показано еще в ранних исследованиях с использованием методов быстрой кинетики [1], происходит в два этапа. Первый, бимолекулярный, этап – это ассоциация белка с сахарофосфатным скелетом тРНК за счет дальнедействующих электростатических взаимодействий. Вторая, мономолекулярная, стадия заключается в конформационных изменениях комплекса, обеспечивающих точную взаимную подстройку фермента и субстрата. Процесс структурных изменений комплекса характерен только для специфичных эффективно взаимодействующих пар: у специфичной гомологичной пары – дрожжевые PheRS и тРНК<sup>Phe</sup> – он протекает в 3–4 раза быстрее, чем у специфичной гетерологичной пары – PheRS *E. coli* и дрожжевая тРНК<sup>Phe</sup>; взаимодействие с неспецифичной тРНК<sup>Tyr</sup>, не являющейся субстратом PheRS, происходит в одну стадию. Конформационная перестройка комплекса индуцируется связыванием концевой акцептирующего нуклеотида тРНК (удаление A76 и его химические модификации приводят к исчезновению или замедлению второй стадии) и распространяется через всю структуру тРНК до антикодонной петли (о чем свидетельствует изменение флуоресценции вайбутозина в положении 37 дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup>). Выполненные позднее исследования РСА для разных тРНК-синтетазных пар, которые будут описаны нами чуть позже, подтвердили важную роль электростатических контактов и структурных изменений обеих макромолекул в образовании комплекса.

Немногочисленные исследования роли элементов узнавания тРНК в обеспечении специфичности взаимодействия на стадии связывания и каталитического превращения, описанные в обзоре [3], показали многообразие механизмов для различных ферментов. С помощью измерений равновесных констант диссоциации ( $K_d$ ) комплексов дрожжевой AspRS, HisRS *E. coli* и PheRS *T. thermophilus* со специфичными тРНК и их мутантными формами выявлено, что взаимодействия ферментов с антикодоном вносят определяющий вклад в стабильность комплексов. Эффективность отбраковки неродственных тРНК на стадии связывания сильно варьирует для разных синтетаз из-за различий как в стабильности родственных комплексов (величины  $K_d$  различаются на один-три порядка), так и в степени сходства специфичных и неспецифичных тРНК. В случае HisRS *E. coli*, которая отличается от AspRS и PheRS низким сродством к своей тРНК, эффективность этого взаимодействия существенно увеличивалась в присутствии устойчивого аналога гистидиладенилата, а сродство к неспецифичным тРНК, наоборот, уменьшалось.

Исследования с помощью методов нестационарной кинетики, выполненные для TrpRS, HisRS и GlnRS *E. coli*, показали существенное влияние мутаций элементов узнавания в тРНК<sup>Trp</sup> (A36 и G73), тРНК<sup>His</sup> (G1-C73) и тРНК<sup>Gln</sup> (U35) на каталитические константы скорости переноса активированных триптофана, гистидина или глутамина на соответствующую тРНК. В случае тРНК<sup>Gln</sup> обнаружено значительное влияние тех же мутаций и на эффективность связывания с GlnRS. Таким образом, элементы узнавания тРНК<sup>Gln</sup> и тРНК<sup>His</sup> важны для эффективного взаимодействия с соответствующими синтетазами на стадиях связывания и каталитического превращения; избирательность взаимодействия TrpRS с тРНК обеспечивается главным образом комплементарностью их комплекса переходному состоянию реакции аминоацилирования.

#### 4.2. Элементы узнавания тРНК в аминоксил-тРНК-синтетазах

Специфичность взаимодействия аминоксил-тРНК-синтетаз с тРНК обеспечивается их взаимным структурным соответствием, что предполагает наличие элементов узнавания как в тРНК, так и в ферментах. Выявление подобных элементов в синтетазах имеет не меньшее значение, чем в тРНК, для решения фундаментальной проблемы узнавания и практических задач биотехнологии по созданию искусственных тРНК-синтетазных пар, специфичных к определенным аминокислотам. Такие работы с использованием сайт-направленного мутагенеза синтетаз и исследований активности и специфичности мутантных форм интенсифицировались с появлением данных РСА; некоторые результаты будут рассмотрены в данном разделе для иллюстрации критической роли отдельных аминокислот или структурных фрагментов синтетаз в узнавании тРНК.

Анализ активности и специфичности мутантных форм GlnRS *E. coli* [16] показал, что остаток Arg341, образующий в кристаллической структуре комплекса специфические контакты с U35, – положительный элемент узнавания антикодона *in vitro* и *in vivo*, а остаток Arg402, взаимодействующий с C36, важен для эффективного аминоацилирования тРНК<sup>Gln</sup> *in vitro* (положительная детерминанта) и отбраковки неспецифичных тРНК *in vivo* (антидетерминанта). Антикодонсвязывающие домены IleRS и MetRS *E. coli* (подкласс Ia) имеют очень похожую трехмерную структуру; разные по химической природе аминокислотные остатки этих доменов – Arg734 в IleRS и Trp461 в MetRS – находятся в эквивалентных позициях по данным множественного выравнивания последовательностей и ответственны за распознавание соответствующих антикодонов: GAU и LAU в тРНК<sup>Ile</sup> (где L – лизидин) и CAU в тРНК<sup>Met</sup> [17]. Одинаковую укладку антикодонсвязывающих доменов (так называемую «ОВ» – «oligomer binding», характерную для многих белков) имеют также AspRS, AsnRS и LysRS (подкласс Ib). Общий нуклеотид тРНК<sup>Lys</sup><sub>UUU</sub>, тРНК<sup>Asp</sup><sub>GUC</sub> и тРНК<sup>Asn</sup><sub>GUU</sub> – U35 – узнается консервативными в трех ферментах остатками Arg, Phe и Gln. Критическая роль в отбраковке неспецифичных тРНК принадлежит подвижной L<sub>45</sub>-петле ОВ-домена (соединяющей 4-ю и 5-ю β-цепи), аминокислотная последовательность которой характерна для каждого из трех ферментов [18]. Замена этого фрагмента в LysRS *E. coli* на соответствующую последовательность AspRS

способствует изменению специфичности фермента по отношению к тРНК-субстрату: величина  $k_{cat}/K_m$  для тРНК<sup>Lys</sup> уменьшается в  $2 \cdot 10^4$  раз, а для тРНК<sup>Asp</sup> увеличивается в  $3,5 \cdot 10^5$  раз. Два остатка этой петли в LysRS, Thr133 и Ser137 – положительные детерминанты узнавания нуклеотидов U34 и U35, а третий остаток, Glu135, служит антидетерминантой против C36. Главным элементом специфичности AspRS, ответственным за отбраковку тРНК<sup>Lys</sup>, является остаток Glu, образующий контакты с 34-м нуклеотидом в кристаллических комплексах AspRSs *E. coli* и дрожжей. Дискриминирующие и недискриминирующие AspRSs в эубактериях и археях (D-AspRSs, специфичные к тРНК<sup>Asp</sup>, и ND-AspRSs, специфичные и к тРНК<sup>Asp</sup>, и к тРНК<sup>Asn</sup>) различаются не только последовательностью, но и размерами L<sub>45</sub>-петли [19]. Этот фрагмент содержит важнейшие для специфичности консервативные аминокислоты: остаток Lys в археобактериальных D-AspRSs и остаток Pro в археобактериальных и эубактериальных ND-AspRSs.

В структурном домене TyrRS, участвующем в связывании акцепторного стебля тРНК, локализован 39-звенный фрагмент, ответственный за узнавание видоспецифичного элемента: пары G1-C72 в эубактериях или пары C1-G72 в эукариотах и археях [20]. Замена этого фрагмента в TyrRS человека на соответствующую последовательность TyrRS *E. coli* (или наоборот) подавляет межвидовой барьер в аминоацилировании – восстанавливает аминоацилирование тРНК<sup>Tyr</sup> гетерологичной TyrRS. Выявлены остатки каталитического домена TrpRS *B. subtilis* (Lys149 и Glu153), ответственные за видовую специфичность аминоацилирования: их замена на остатки аминокислот в эквивалентных позициях TrpRS человека увеличивает каталитическую эффективность аминоацилирования тРНК<sup>Trp</sup> человека бактериальным ферментом [21].

Основной элемент узнавания всех известных тРНК<sup>Ala</sup> разного происхождения – пара G3-U70, и лишь в митохондриальной тРНК<sup>Ala</sup> *D. melanogaster* она смещена на одну позицию к началу акцепторного стебля. Такое «смещение» детерминанты специфичности тРНК<sup>Ala</sup> обусловлено наличием в каталитическом домене митохондриальной AlaRS необычной вставки, образованной дополнительным 27-звенным пептидом [22].

Приведенные выше примеры показывают, что видовые различия в элементах специфичности тРНК коррелируют со структурным разнообразием соответствующих синтетаз, свидетельствуя в пользу их согласованной эволюции. Совершенствование ферментов происходило путем оптимизации механизмов взаимодействия со специфичной тРНК и отбраковки неспецифичных тРНК.

### 4.3. Структура комплексов синтетаз с тРНК

К 2010 г. с помощью РСА установлена трехмерная структура 30-ти комплексов аминоксил-тРНК-синтетаз, различных по специфичности и происхождению, с соответствующими тРНК [3, 11]. Результаты этих исследований чрезвычайно важны для понимания молекулярных основ избирательного взаимодействия синтетаз с тРНК, поскольку позволили описать в деталях природу контактов и конформационные изменения макромолекул. Общим свойством синтетаз класса I (кроме TyrRS и TrpRS) является образование контактов с тРНК со стороны малой бороздки акцепторного стебля, а ферментов класса II, TyrRS и TrpRS – со стороны большой бороздки, вследствие чего переменная петля тРНК экспонирована в раствор (класс I) или обращена к белку (класс II) (рис. 1.9). Связывание синтетазами разных классов молекулы тРНК с противоположных сторон подтверждено экспериментами по защите тРНК в комплексе с ферментом от химической модификации и нуклеазного гидролиза на примере тРНК<sup>Asp</sup>, являющейся субстратом AspRS (класс II) и ArgRS (класс I).

Разные участки тРНК взаимодействуют с определенными структурными доменами фермента, образуя обширную контактную область – около 20 % доступной растворителю поверхности тРНК. Общее число доменов и степень их участия в связывании тРНК-субстрата значительно варьируют для различных пар (табл. 1.6). В кристаллических комплексах функциональных димеров – TyrRS, TrpRS и всех aaRSs класса II – содержится, как правило, две молекулы тРНК на молекулу белка; присутствие одной молекулы тРНК в комплексах ProRS и SerRS авторы объясняют эффектами упаковки молекул в кристаллах.

Обе субъединицы димерных aaRSs, а в случае PheRS все четыре субъединицы ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>-гетеротетрамера участвуют в связывании каждой молекулы тРНК. Протяженные контакты между молекулой тРНК и симметрично расположенным вторым мономером фермента ( $\alpha\beta$ -гетеродимером в случае PheRS) характерны для большинства комплексов, и лишь один нуклеотид акцепторной ветви тРНК<sup>Asp</sup> вовлечен в перекрестные взаимодействия в комплексах AspRSs *E. coli* и дрожжей. В большинстве комплексов лишь часть нуклеотидов тРНК, вовлеченных во взаимодействия с ферментом, относится к элементам специфичности (см. табл. 1.6). В то же время почти все из числа нуклеотидов, контактирующих с GlnRS *E. coli* и TyrRS *M. jannaschii*, выполняют эту функцию. Для шести комплексов – дрожжевой ArgRS, ThrRS и AspRS *E. coli* и трех различных TyrRSs – характерно прямое узнавание всех находящихся в контакте с белком элементов специфичности тРНК путем взаимодействия с основаниями. В большинстве комплексов часть важных для специфичности нуклеотидов взаимодействует с белком посредством рибозофосфатных остатков, а часть не образует контактов вообще, и их непрямая роль в узнавании сводится к созданию оптимальной конформации тРНК. Со стороны синтетаз во взаимодействиях с тРНК вовлечены чаще всего боковые цепи аминокислот, хотя это не является общим свойством. Так, в комплексах LysRS и ArgRS исключительно пептидный скелет находится в контакте с некоторыми элементами специфичности в антикодоне.

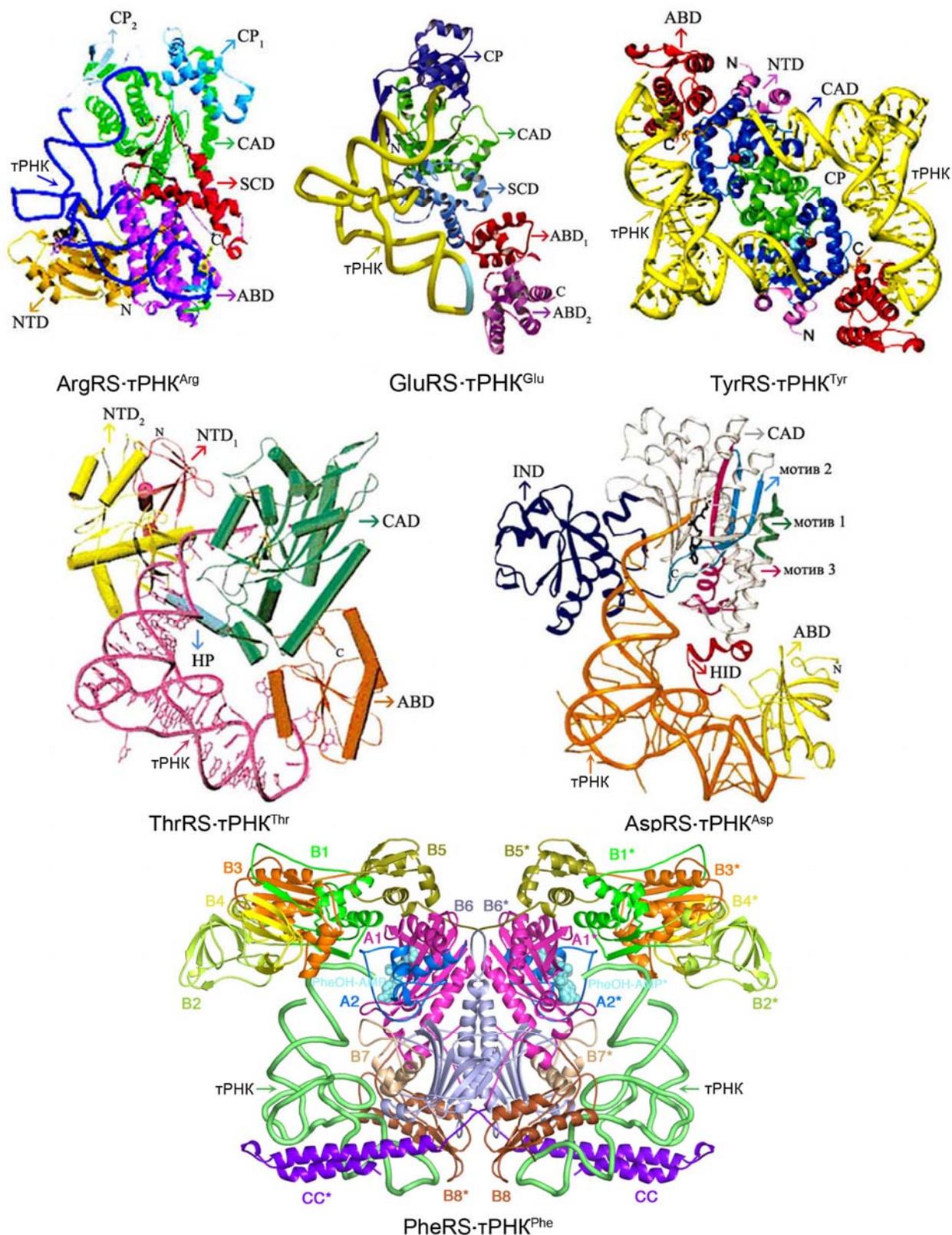


Рис. 1.9. Структура комплексов аминокислот-тРНК-синтетаз, принадлежащих разным подклассам, со специфическими тРНК: ArgRS *S. cerevisiae*, TyrRS *M. jannaschii*, GluRS, ThrRS и AspRS *E. coli* и PheRS *T. thermophilus*. Для ThrRS и AspRS показана одна субъединица димера. Структурные домены белков изображены разным цветом и обозначены, как принято в оригинальных работах. В молекуле PheRS структурные домены A1, A2 и CC принадлежат  $\alpha$ -субъединице, домены B1–B8 принадлежат  $\beta$ -субъединице; домены симметрично связанного  $\alpha\beta$ -гетеродимера отмечены звездочкой. Рисунки воспроизведены из работ [23–28]

Таблица 1.6

## Структурные характеристики комплексов аминоксил-тРНК-синтетаз с тРНК

AaRS, организм; субъединичный состав	Число структурных доменов aaRS		Число нуклеотидов тРНК в контакте с белком	
	общее <sup>а</sup>	связывающих тРНК <sup>б</sup>	общее <sup>в</sup>	элементов узнавания
ArgRS, <i>S. cerevisiae</i> ; $\alpha$	6	3	8	2
CysRS, <i>E. coli</i> ; $\alpha$	6	6	12	5
GlnRS, <i>E. coli</i> ; $\alpha$	6	6	12	11
GluRS, <i>T. thermophilus</i> ; $\alpha$	5	5	7	3 <sup>г</sup>
TyrRS, <i>T. thermophilus</i> ; $\alpha_2$	5	2 + 2	13	5 <sup>г</sup>
TyrRS, <i>M. jannaschii</i> ; $\alpha_2$	4	1 + 2	6	5
TrpRS, <i>H. sapiens</i> ; $\alpha_2$	4	1 + 3	9	5
ThrRS, <i>E. coli</i> ; $\alpha_2$	5	3 + 1	12	5
AspRS, <i>E. coli</i> ; $\alpha_2$	4	4 + 1	21	8
AspRS, <i>S. cerevisiae</i> ; $\alpha_2$	3	3 + 1	15	5
PheRS, <i>T. thermophilus</i> ; $(\alpha\beta)_2$	3 + 8	2 + 1 + 4 + 1	18	9

<sup>а</sup> Для функциональных димеров приведено число доменов в субъединице или двух разных субъединицах PheRS.

<sup>б</sup> Для олигомерных синтетаз отдельно указано число доменов, принадлежащих разным субъединицам и связывающих каждую молекулу тРНК.

<sup>в</sup> Без учета нуклеотидов ССА-конца, не упорядоченного в некоторых комплексах.

<sup>г</sup> Данные по узнаванию для структурно гомологичных синтетаз из *E. coli*.

Конформационные изменения синтетаз и тРНК, выявленные сравнением структур комплексов со структурами отдельных макромолекул и обусловленные формированием комплекса, различаются для разных комплексов. Для большинства синтетаз характерны смещения антикодонсвязывающего домена (для его обозначения в англоязычных работах принято сокращение ABD) и других связывающих тРНК доменов относительно друг друга и каталитического домена (формирующего активный центр) без изменения общей укладки. ABD в TyrRS и CysRS и N-концевой биспиральный домен в SerRS и малой субъединице PheRS (известный как домен CC, от англ. coiled coil) становятся упорядоченными и «видимыми» в структуре только в комплексах с тРНК. Наиболее сильные структурные изменения тРНК свойственны антикодонной петле: в большинстве комплексов она деформируется с нарушением стэкинга некоторых оснований; тРНК<sup>Cys</sup>, тРНК<sup>Glu</sup> и тРНК<sup>Phe</sup> имеют в комплексах почти такую же U-образную конформацию петли, как в свободной тРНК<sup>Phe</sup>. Конформация антикодонной петли тРНК в комплексе стабилизируется не только контактами с белком, но и новыми внутримолекулярными взаимодействиями. Так, уникальные пары образуются в тРНК<sup>Ile</sup> (U33-U36), тРНК<sup>Thr</sup> (G35-U36) и тРНК<sup>Gln</sup>

(U32-Ψ38 и U33-A37). В комплексе тРНК<sup>Met</sup> с MetRS все пять оснований антикодоновой петли связаны между собой водородными связями. При взаимодействии тРНК<sup>Val</sup> с ValRS деформируется вся антикодоновая ветвь, и разрушаются самые удаленные от антикодона пары C27-G43 и U28-A42. Молекула тРНК<sup>Asp</sup> становится более компактной в комплексах разных AspRSs вследствие уменьшения угла между двумя непрерывными спиралями L-образной формы; структура дрожжевой тРНК<sup>Asp</sup> в комплексе стабилизирована необычным третичным взаимодействием между антикодоновой петлей и D-стеблем. Общим свойством комплексов синтетаз класса I является изменение конформации акцепторной ветви тРНК: 3'-одноцепочечный фрагмент принимает U-образную конформацию, которая стабилизирована специфичными для каждой пары внутримолекулярными и межмолекулярными взаимодействиями; иногда деформация акцепторной ветви сопровождается разрушением первой пары оснований.

Структура доменов, связывающих антикодоновую петлю (ABD), консервативна в каждом подклассе. Исключение составляет подкласс Ib, объединяющий GlnRS и GluRS, которые имеют по два таких домена и различаются их топологией. В LeuRS, не узнающей антикодон, также имеется домен, соответствующий по топологии подкласса ABD-домену; он участвует в узнавании особенностей третичной структуры тРНК<sup>Leu</sup>. Некоторые примеры своеобразных механизмов связывания антикодона структурно гомологичными доменами разных синтетаз, обеспечивающих уникальную конформацию антикодоновой петли в каждом комплексе, показаны на рис. 1.10.

Одинаковые фрагменты ABD, состоящего из пучка  $\alpha$ -спиралей в подклассе Ia (см. рис. 1.10), участвуют в связывании и узнавании A35 тРНК<sup>Ile</sup> и тРНК<sup>Val</sup> (1-я и 3-я  $\alpha$ -спирали), а C35-узнающая ArgRS использует другой фрагмент (петлю между 3-й и 4-й  $\alpha$ -спиралями). Вариабельный нуклеотид в позиции 34 тРНК<sup>Ile</sup> связывается N-концевым и характерным для IleRS C-концевым доменами, а в тРНК<sup>Arg</sup> и тРНК<sup>Val</sup> он не узнается и не взаимодействует с соответствующей aaRS. A35 и C36 в тРНК<sup>Val</sup> находятся в стэкинге и узнаются как последовательность, которая не встречается в других тРНК (ни A34C35, ни A36C37). Свободный от контактов с белком U36 в тРНК<sup>Ile</sup> участвует в стабилизации конформации антикодоновой петли, образуя пару с U33, который в свою очередь находится в стэкинге с A38 и C32. С-концевой домен ValRS отличается по структурной топологии от соответствующего домена IleRS и взаимодействует не с антикодоном, а с D-петлей и третичной парой G19-C56. Два домена ABD в GlnRS и GluRS играют разную роль в узнавании антикодона: первый образует контакты с C36 тРНК<sup>Glu</sup>, второй – с C34 и U35 тРНК<sup>Glu</sup> или с C34 и G36 тРНК<sup>Gln</sup>, и оба домена взаимодействуют с U35 тРНК<sup>Gln</sup>. Только в комплексе GluRS с тРНК<sup>Glu</sup> все три основания антикодона сохраняют стэкинг-взаимодействия.

В синтетазах подкласса Ib ABD расположен на N-конце полипептидной цепи, тогда как в остальных aaRSs соответствующий домен находится ближе к C-концу. Характерная для подкласса Ib топология известна как OB-укладка, обнаруженная в ряде РНК- и ДНК-связывающих белков. Домен с такой укладкой существует в PheRS, но функцию антикодонсвязывающего домена выполняет С-концевой домен  $\beta$ -субъединицы, имеющий другую характерную для

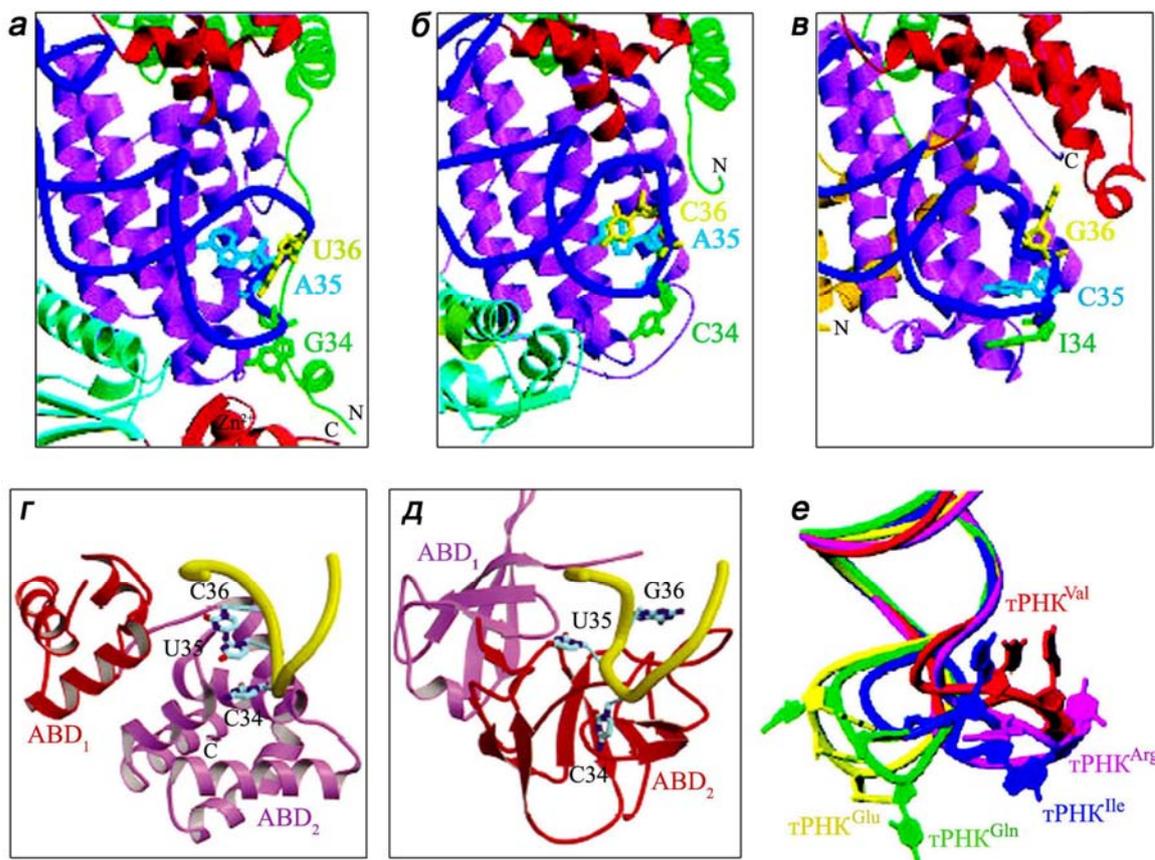


Рис. 1.10. Сравнение механизмов взаимодействия аминоксил-тРНК-синтетаз подклассов Ia и Ib с антикодоном специфичных тРНК: IleRS (а), ValRS (б), ArgRS (в), GluRS (г) и GlnRS (д). В узнавании антикодона тРНК<sup>Ile</sup> участвуют наряду с антикодонсвязывающим доменом (фиолетового цвета) N-концевые и С-концевые домены IleRS (зеленого и красного цвета соответственно); е – суперпозиция антикодоновых петель пяти тРНК в соответствующих комплексах. Рисунки воспроизведены из работ [23, 25]

тРНК-связывающих белков топологию. В одном из ферментов подкласса Ic – SepRS – обнаружен уникальный тип укладки ABD, который не встречается ни в одной из известных структур.

Среди доменов, ответственных за связывание других участков тРНК, существуют характерные для класса, подкласса или для отдельных синтетаз. Свойственные классу I вставки в каталитический домен, известные как соединительные пептиды (CP на рис. 1.9), взаимодействуют с акцепторным стеблем тРНК во всех закристилизованных комплексах. В ферментах подкласса Ia, имеющих 2–3 вставки, эту функцию выполняет домен CP<sub>2</sub>. В синтетазах подклассов Ia и Ib имеется спиральный домен (SCD на рис. 1.9), расположенный в трехмерной структуре между ABD и каталитическим доменом (CAD) и образующий контакты с D-стеблем тРНК. В ферментах подкласса Ib подобный домен небольшого размера (названный шарнирным, НИД на рис. 1.9) взаимодействует с D- и акцепторным стеблями тРНК, осуществляя связь ABD-домена с активным центром. Уникальные домены со своеобразной для определенных синтетаз топологией узнают особенности третичной структуры тРНК.

N-концевые домены ArgRS и GlnRS образуют специфические контакты с D-петлей, а С-концевой биспиральный домен ValRS – с D- и Т-петлями соответствующих тРНК. Узнавание длинной V-ветви тРНК<sup>Tyr</sup>, тРНК<sup>Leu</sup> и тРНК<sup>Ser</sup> обеспечивается ее взаимодействием с С-концевым доменом эубактериальных TyrRSs и архебактериальных LeuRSs или N-концевым биспиральным доменом SerRS.

Структурные исследования комплексов с тРНК для синтетаз одной специфичности, но из эволюционно различных видов организмов выполнены лишь для LeuRS, TyrRS и AspRS. Они имеют решающее значение для детального понимания молекулярных основ видовых различий в механизмах узнавания тРНК, особенно при отсутствии перекрестного аминоацилирования тРНК специфичной aaRS другого происхождения. Яркий пример – сравнительный анализ структуры комплексов двух Tyr-специфичных пар из архебактерии *M. jannaschii* и эубактерии *T. thermophilus* (рис. 1.11).

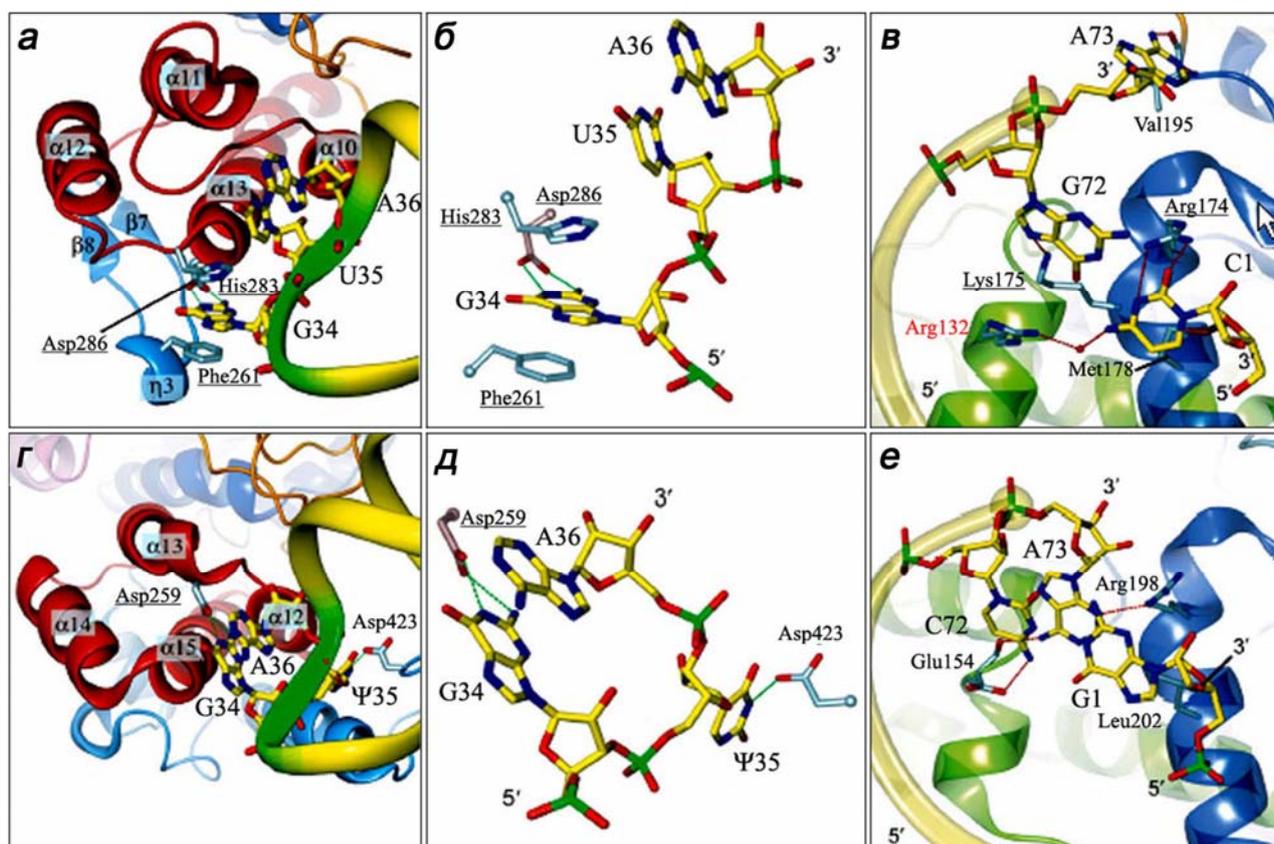


Рис. 1.11. Основные различия в механизмах узнавания антикодона и акцепторного стебля тРНК<sup>Tyr</sup> *M. jannaschii* (а–в) и *T. thermophilus* (г–е). Антикодонсвязывающие домены ABD красного цвета; характерная для архебактериальной TyrRS β-η-β-вставка в ABD и С-концевой домен CTD эубактериальной TyrRS – голубого цвета (а, г). Каталитический домен CAD и соединительный пептид CP – синего и зеленого цвета соответственно (в, е). Остатки аминокислот, консервативные во всех TyrRSs, выделены красным цветом; характерные для эубактериальных или архебактериальных TyrRSs – подчеркнуты. Рисунки воспроизведены из работы [24]

По гомологии аминокислотных последовательностей TyrRSs из архебактерий объединяются в одну группу с TyrRSs из эукариот, но не имеют в структуре С-концевого домена (CTD), следующего за ABD; структурная топология CTD отличается в ферментах эукариот и эубактерий. Прямое узнавание главного элемента специфичности тРНК<sup>Tyr</sup> *M. jannaschii*, G34, обеспечивается взаимодействиями с тремя остатками из ABD, консервативными в TyrRSs архей и эукариот (см. рис. 1.11). В связывании антикодона тРНК<sup>Tyr</sup> *T. thermophilus* участвуют два домена: слабая детерминанта G34 взаимодействует с консервативным остатком из ABD, а важнейший элемент Ψ35 – с неконсервативным остатком из CTD. CTD участвует в узнавании наряду с антикодоном длинной V-ветви. Два домена – каталитический (CAD) и вставка в него (CP) – вовлечены в связывание первой пары акцепторного стебля обеих тРНК<sup>Tyr</sup> (C1-G72 или G1-C72) и A73 тРНК<sup>Tyr</sup> *T. thermophilus*, и лишь один остаток из CAD взаимодействует с A73 тРНК<sup>Tyr</sup> *M. jannaschii*. Аминокислотные остатки, ответственные за узнавание нуклеотидов в одинаковых позициях двух тРНК<sup>Tyr</sup>, различаются по консервативности и химической природе. Конформации антикодоновой петли и акцепторной ветви сильно различаются в двух комплексах: G34 образует стэкинг с A36, а A73 – с первой парой акцепторного стебля только в эубактериальной тРНК. Выявленные различия в структуре двух комплексов нашли практическое применение в создании искусственных тРНК-синтезных пар с измененной специфичностью, которые используются для получения рекомбинантных белков с необычными биохимическими и биофизическими свойствами путем направленного включения нестандартных аминокислот [29].

#### **4.4. Влияние низкомолекулярных субстратов на взаимодействие аминоксил-тРНК-синтез с акцепторным концом тРНК**

Первые исследования, свидетельствующие о важной роли универсального 3'-ССА-конца в аминокислотировании тРНК, были выполнены в 1970–1980-е годы [1]. Тогда же было обнаружено влияние низкомолекулярных субстратов (аминокислоты и АТФ) на образование комплексов синтез с тРНК и обратное влияние тРНК на синтез аминокислотаденилата (не только «тРНК-зависимыми» ферментами) и высказана идея о триггерной роли 3'-концевого аденозина в структурной подстройке aaRS и тРНК, ведущей к образованию каталитически активного комплекса. Молекулярную природу взаимосвязи трех разных субстратов удалось окончательно прояснить с помощью анализа структуры комплексов синтез с тРНК, закристиллизованных в разных функциональных состояниях: в отсутствие малых лигандов или в их присутствии. Обычно для предотвращения аминокислотирования тРНК ее комплекс с aaRS кристаллизуют в присутствии устойчивого аналога аминокислотаденилата (полученного конденсацией аминокислоты с АМР или аминокислоты с сульфамидаденозином), или один из малых субстратов заменяют на неактивный в реакции активации аналог (вместо аминокислоты используют аминокислотный спирт; вместо АТФ – АМР или аналог АТФ, содержащий метиленовую группу в трифосфатной цепи). Продуктивный

комплекс синтетазы с тРНК и аминокислотаденилатом, в котором акцепторный конец правильно ориентирован относительно активированного остатка аминокислоты, но этерификации тРНК в условиях кристаллизации не происходит, удалось получить только для AspRS.

Структурные данные, полученные для «тРНК-зависимых» ArgRS, GlnRS и GluRS [30–32], позволили объяснить «эффекторную» роль тРНК во взаимодействии этих aaRSs с малыми субстратами. Связывание акцепторного конца тРНК индуцирует структурные перестройки в активном центре aaRS, необходимые для окончательного формирования сайта связывания специфичной аминокислоты, а в случае GluRS – и для продуктивного взаимодействия с АТФ. Для комплексов GlnRS и GluRS характерно непосредственное участие 3'-концевой рибозы тРНК в связывании аминокислотного субстрата. В свою очередь, взаимодействие GluRS с АТФ, а ArgRS с Arg-субстратом оказывает влияние на связывание ССА-конца, не упорядоченного в двойных комплексах ферментов с тРНК. Ключевую роль в структурной динамике активных центров играют два подвижных петлеобразных фрагмента, несущих характерные для класса I мотивы, и консервативный остаток Туг (находящийся в эквивалентных позициях всех трех ферментов), который кооперирует в связывании 3'-концевого аденозина тРНК и аминокислотного субстрата.

Механизмы, ответственные за координацию взаимодействий с тремя субстратами и динамику реакции аминокислотирования, особенно разнообразны для синтетаз класса II: в их реализации участвуют подвижные фрагменты каталитического домена, число которых и степень консервативности (в пределах всего класса или синтетаз одной специфичности), а также функциональная роль общих фрагментов значительно различаются (табл. 1.7). В SerRS такую функцию выполняет только характерная для класса петля мотива 2, имеющая в Ser-специфичных aaRSs самые протяженные размеры. Две конформации петли в комплексах SerRS•тРНК<sup>Ser</sup>•Ser-AMS или SerRS•Ser-AMS (где Ser-AMS – устойчивый аналог сериладенилата) стабилизируются своеобразной сетью взаимодействий внутри молекулы белка и с лигандами; ключевую роль в «переключении» конформаций играет остаток Glu258, взаимодействующий с G73 тРНК<sup>Ser</sup> или с Ser-AMS в разных комплексах. Акцепторный конец тРНК<sup>Ser</sup> ориентирован в активный центр только в присутствии Ser-AMS, но позиция A76 в тройном комплексе остается нестабильной.

ThrRS, принадлежащая тому же подклассу, что и SerRS, использует для связывания акцепторной ветви тРНК<sup>Thr</sup> четыре петли, конформации которых зависят от присутствия или отсутствия субстратов и их природы (рис. 1.12). Взаимодействия ThrRS с треонином и АТФ (или АМР) индуцируют самые сильные смещения фрагментов, названных Thr- и АТФ-петлей; Thr-петля, в свою очередь, стабилизирует благодаря внутримолекулярным взаимодействиям ориентацию так называемой «упорядочивающей» (ordering) петли. В результате этих перестроек все три петли принимают конформацию, необходимую для продуктивного связывания ССА-конца тРНК<sup>Thr</sup>. Петля мотива 2 и АТФ-петля кооперируют в связывании ССА-конца тРНК и АТФ (см. табл. 1.7).

**Структурные фрагменты активных центров синтетаз класса II,  
ответственные за продуктивное связывание акцепторного конца тРНК**

Комплекс aaRS <sup>a</sup>	Петля мотива 2 <sup>б</sup>	Мотив 3 <sup>б</sup>	Подвижная петля <sup>б, в</sup>	Другие фрагменты <sup>б</sup>
SerRS <i>T. t.</i> : тРНК <sup>Ser</sup> + Ser-AMS [33]	255–273: <b>R256</b> , V272, <b>F275</b> ↔AMS; <b>E258</b> ↔G73; S261, F262, K264, R267↔G1, G2, U68, C69, C71; <b>R271</b> ↔C74; E273, E279↔Ser			
ThrRS <i>E. c.</i> : тРНК <sup>Thr</sup> + AMP [26, 34]	363–377: <b>R363</b> ↔A76, AMP; <b>R375</b> ↔C74; E365, V376, <b>F379</b> ↔AMP	506–534: S517, <b>R520</b> ↔AMP	301–317: H309, Y313, A316↔A76	Thr-петля 417– 466: Y462↔A76 АТР-петля 468– 480: R476↔G71; Q479↔AMP
AspRS <i>E. c.</i> : тРНК <sup>Asp</sup> + Asp-AMP [27]	216–227: <b>R217</b> ↔AMP, Asp; <b>E219</b> , D220, L221, R222, A223, D224, R225↔C71, C72, G73, C74; Q226, Q231, F229↔AMP; Q231, D233↔Asp	523–555: <b>R537</b> ↔C75, AMP; R549↔U69, U70	167–174: T169, P170↔A76; R174↔C74	Q(S/A)PQ-мотив 190–199: S193↔A76, Asp; L196↔A76; Q195, K198↔Asp HF-петля 448– 453: F451↔A76; H448↔AMP, Asp
AspRS <i>S. c.</i> : тРНК <sup>Asp</sup> + Asp-AMP [35, 36]	324–334: <b>R325</b> ↔AMP, Asp; <b>E327</b> , N328, S329, R330, T331, H334↔U1, A72, G73, C74, C75	517–549: G528, <b>R531</b> ↔AMP	277–285: S280, <b>E281</b> , G283↔A76; S284↔C75	Q(S/A)PQ-мотив 298–307: Q300, <b>S301</b> , F304↔A76; Q303↔Asp Y-петля 453–458: Y456↔A76
PheRS <i>T. t.</i> : тРНК <sup>Phe</sup> + PheOH-AMP [28]	204–214: <b>R204</b> , E206, H212↔A76, AMP; Q207↔U68; <b>F216</b> ↔AMP	312–327: <b>R321</b> ↔A76, AMP	138–152: <b>Met148</b> ↔A76	

<sup>a</sup> Комплекс aaRS с тРНК закристаллизован в присутствии малого лиганда, где PheOH-AMP – фенилаланинил-5'-аденилат, Ser-AMS – 5'-O-[N-(L-серил)сульфамоил]аденозин.

<sup>б</sup> Указаны номера остатков, образующих фрагмент, и взаимодействия его остатков с нуклеотидами тРНК и малыми лигандами. Полу жирным шрифтом выделены характерные для класса II остатки; подчеркнуты остатки, взаимодействующие в отсутствие тРНК с «уходящей» пирофосфатной группой; рамкой выделены остатки, взаимодействующие в отсутствие тРНК с малыми лигандами.

<sup>в</sup> Петля названа упорядочивающей в ThrRS (см. рис. 1.12), перекидной – в AspRS (рис. 1.13) и спиральной – в PheRS; петли занимают эквивалентные позиции в трехмерной структуре каталитических доменов трех синтетаз.

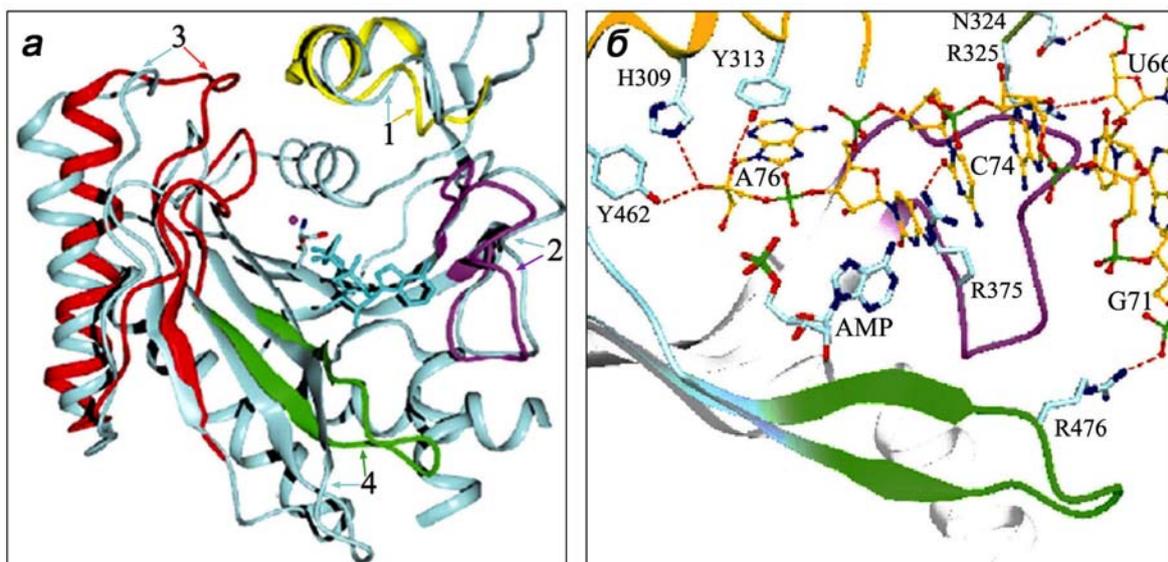


Рис. 1.12. Структурная динамика активного центра ThrRS: *a* – изменения конформаций упорядочивающей петли (1, желтого цвета), петли мотива 2 (2, фиолетового цвета), Thr-петли (3, красного цвета) и АТР-петли (4, зеленого цвета) по сравнению с нативным ферментом (серого цвета), индуцированные взаимодействиями ThrRS с малыми субстратами или устойчивым аналогом треониладенилата; *б* – взаимодействия подвижных фрагментов ThrRS с акцепторной ветвью тРНК<sup>Thr</sup> в присутствии АМР. Рисунки воспроизведены из работ [26, 34]

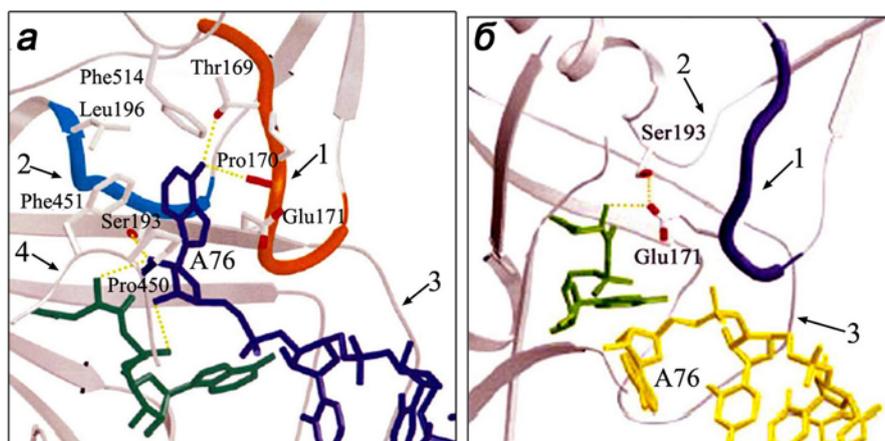


Рис. 1.13. Конформации подвижных фрагментов активного центра AspRS *E. coli* в различных комплексах: *a* – с гомологичной тРНК<sup>Asp</sup> и Asp-АМР; *б* – с дрожжевой тРНК<sup>Asp</sup> и Asp-АМР. Молекула Asp-АМР показана зеленым цветом, ССА-конец тРНК<sup>Asp</sup> *E. coli* или дрожжей синего или желтого цвета. Подвижные фрагменты: 1 – перекидная петля, 2 – Q(S/A)PQ-мотив, 3 – петля мотива 2, 4 – HF-петля. «Открытая» конформация перекидной петли в продуктивном комплексе (*a*) стабилизирована взаимодействиями с концевым аденозином тРНК, а «закрытая» конформация (*б*) – с Asp-АМР. Рисунки воспроизведены из работ [27, 36]

Для взаимодействия AspRS с акцепторной ветвью тРНК-субстрата не требуется присутствия малых субстратов, но в их отсутствие A76 тРНК<sup>Asp</sup> занимает позицию АТР. В продуктивном взаимодействии AspRS с тРНК<sup>Asp</sup> наряду с петлей мотива 2 участвуют так называемая «перекидная» (flipping) петля (которая топологически эквивалентна упорядочивающей петле ThrRS), характерный для AspRS Q(S/A)PQ-мотив (который соответствует TxE-петле, консервативной в остальных aaRSs класса II и ответственной за связывание основной цепи аминокислотного субстрата) и С-концевая петля, именуемая HF- или Y-петлей по функциональным остаткам, консервативным в эубактериальных или эукариотических и архебактериальных AspRSs (см. табл. 1.7). Перекидная петля в комплексе AspRS•тРНК<sup>Asp</sup>•Asp-AMP находится в «открытой» конформации и участвует в связывании акцепторного конца, стабилизируя необходимую для переноса Asp-субстрата ориентацию остатка рибозы A76 (см. рис. 1.13, а). В отсутствие тРНК<sup>Asp</sup> перекидная петля взаимодействует с Asp-субстратом и принимает «закрытую» конформацию.

В неактивном комплексе AspRS *E. coli* с плохим субстратом – дрожжевой тРНК<sup>Asp</sup> – перекидная петля также находится в «закрытой» конформации, стабилизированной ее взаимодействием с Asp-AMP, и A76 ориентирован в сторону от активного центра (см. рис. 1.13, б). Концевые фрагменты перекидной петли в двух разных конформациях фиксируются внутримолекулярными взаимодействиями с Q(S/A)PQ-мотивом. Q(S/A)PQ-мотив, в свою очередь, кооперирует в связывании A76 и Asp-субстрата (см. табл. 1.7), что дополнительно стабилизирует взаимную ориентацию участников реакции в активном центре. Кооперативные взаимодействия С-концевой петли (HF-петли) AspRS с тРНК<sup>Asp</sup> и Asp-AMP характерны лишь для комплекса эубактериального фермента.

Анализ структуры тройного комплекса PheRS•тРНК<sup>Phe</sup>•PheOH-AMP в сравнении со структурой двойного комплекса PheRS•тРНК<sup>Phe</sup> показал значительное изменение конформации 3'-конца, индуцируемое устойчивым аналогом фенилаланиладенилата (рис. 1.14). Позиция A76 тРНК<sup>Phe</sup> в двойном комплексе перекрывается с сайтом связывания Phe-субстрата, а в тройном комплексе акцептирующий нуклеотид связан вблизи AMP-части аналога аденилата благодаря взаимодействиям с петлей мотива 2, мотивом 3 и спиральной петлей 139–152 (см. рис. 1.14, а и б). Четыре остатка из мотивов 2 и 3 – Arg $\alpha$ 204, Glu $\alpha$ 206, His $\alpha$ 212 и Arg $\alpha$ 321 – кооперируют в связывании нуклеотидного субстрата и тРНК<sup>Phe</sup>. Конформация АССА-конца в двойном и тройном комплексах стабилизирована разными взаимодействиями с остатками  $\beta$ -субъединицы (см. рис. 1.14, в). Специфические контакты между основанием С75 и остатками Glu $\beta$ 31 и Asp $\beta$ 33 из домена В1 характерны только для тройного комплекса; другие остатки этого домена (Met $\beta$ 1 и Arg $\beta$ 2) взаимодействуют с фосфатной группой С74 в двойном комплексе. Два остатка домена В3, His $\beta$ 358 и Arg $\beta$ 362, взаимодействующие с остатком рибозы С74 в отсутствие PheOH-AMP, находятся в контакте с фосфатной группой С75 в тройном комплексе. Нуклеотид А73, входящий в набор элементов узнавания тРНК<sup>Phe</sup>, свободен от контактов с белком в обоих комплексах, но в тройном комплексе его основание вовлечено во внутримолекулярные взаимодействия (водородные связи с С74 и стэкинг с первой парой

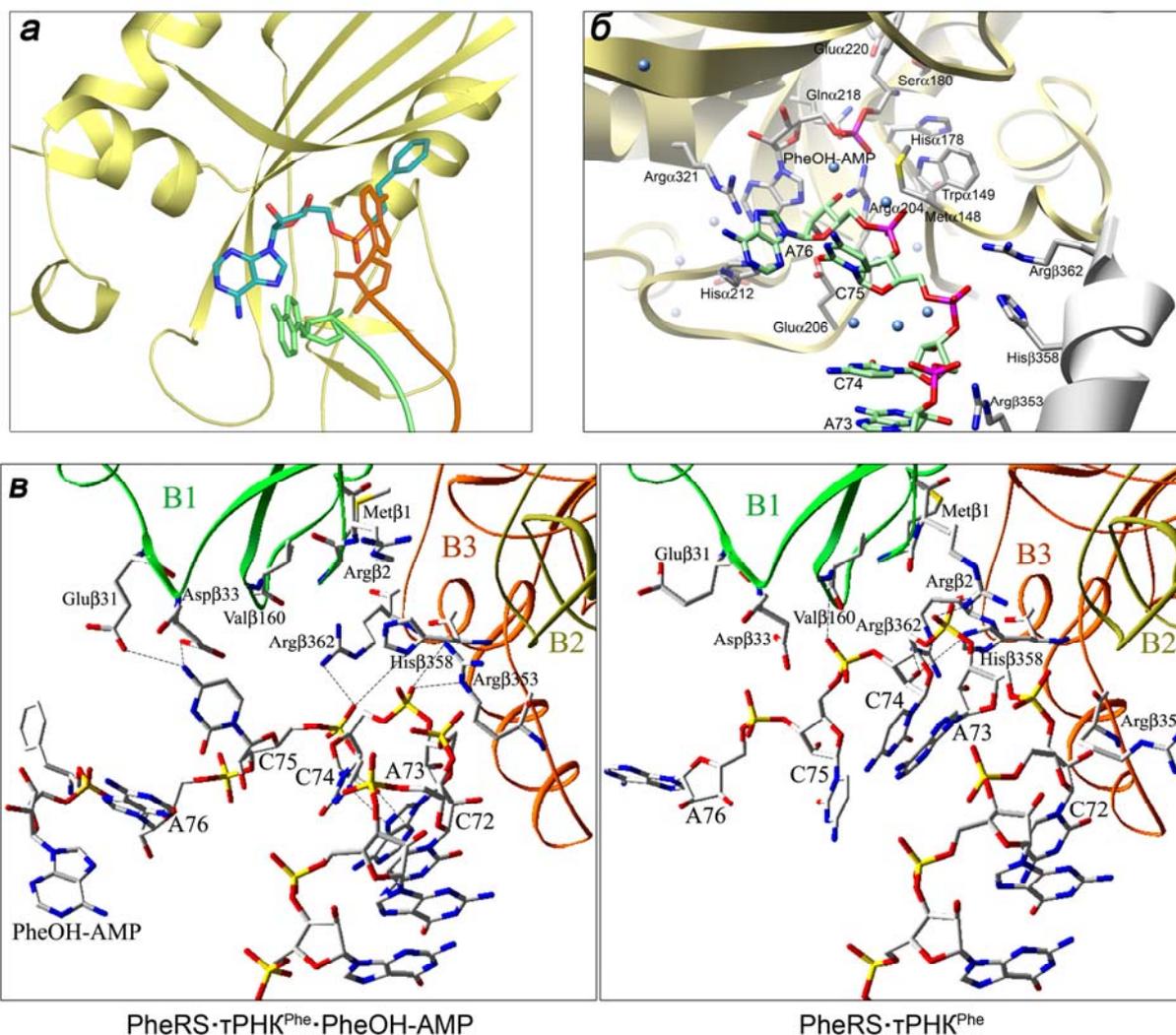


Рис. 1.14. Взаимодействия PheRS *T. thermophilus* с акцепторным концом тРНК<sup>Phe</sup> в комплексах PheRS·тРНК<sup>Phe</sup>·PheOH-AMP и PheRS·тРНК<sup>Phe</sup>: *a* – ориентация А76 в активном центре в отсутствие или в присутствии PheOH-AMP (коричневого или зеленого цвета соответственно); *б* – взаимное расположение PheOH-AMP, 3'-АССА-конца и взаимодействующих с ними остатков белка; *в* – взаимодействия ССА-конца тРНК<sup>Phe</sup> с β-субъединицей в двух комплексах. Пептидный скелет α-субъединицы – светло-желтого цвета, а β-субъединицы – серого цвета; сферы голубого цвета – молекулы воды. Пунктирными линиями показаны водородные связи между нуклеотидами тРНК и остатками белка и внутримолекулярные связи с участием А73 (*в*)

акцепторного стебля), которые дополнительно стабилизируют деформированную структуру АССА-конца.

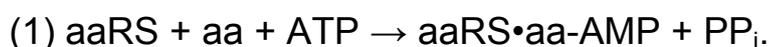
Петля мотива 2 играет универсальную роль в разных синтетазах класса II – она вовлечена в кооперативные взаимодействия с АТР (или АМР в составе аденилата) и акцепторной ветвью тРНК (см. табл. 1.7). Участие классинвариантного остатка Arg из мотива 2 в связывании А76 – общее свойство PheRS и ThrRS, относящихся к разным подклассам; однако главная роль в связывании акцептирующего нуклеотида принадлежит разным фрагментам: петле мотива 2 в случае PheRS или упорядочивающей петле в случае ThrRS.

Кооперативные взаимодействия с АТФ(АМР) и тРНК с использованием инвариантного остатка Arg из мотива 3 – общее свойство PheRS *T. thermophilus* и AspRS *E. coli*. «Переключение» этого остатка с  $\gamma$ -фосфата АТФ на акцепторный конец тРНК (A76 тРНК<sup>Phe</sup> или C75 тРНК<sup>Asp</sup>) может благоприятствовать освобождению пирофосфата и завершению первой стадии реакции. Аналогичную функцию в ThrRS и SerRS выполняет консервативный в этих ферментах остаток Arg из петли мотива 2 (Arg375 и Arg271), взаимодействующий с C74 тРНК<sup>Thr</sup> и тРНК<sup>Ser</sup> в соответствующих тройных комплексах.

Анализ структурных данных показал, что: 1) координация взаимодействий aaRS с тремя субстратами, необходимая для эффективного синтеза и освобождения продуктов, обеспечивается тонкой подстройкой комплекса фермента с тРНК, контролируемой малыми лигандами; 2) механизмы, обеспечивающие продуктивное взаимодействие с акцепторным концом тРНК, своеобразны для каждой синтетазы. Во взаимную подстройку двух макромолекул на завершающем этапе продуктивного взаимодействия могут быть вовлечены удаленные от активного центра фрагменты. Такие протяженные структурные изменения зарегистрированы для комплекса PheRS, и их функциональная значимость подтверждена независимыми исследованиями в растворе [28].

## Глава 5. Неканонические функции аминоксил-тРНК-синтетаз

У целого ряда аминоксил-тРНК-синтетаз обнаружены необычные дополнительные функции, отличные от основной функции аминоксилации тРНК. Наиболее важные и интересные результаты многочисленных исследований в этой области описаны в ряде обзоров [11, 37–40]. Большинство синтетаз (за исключением подкласса IIb) катализируют синтез динуклеозидолигофосфатов  $Ap_nN$  (где  $n = 2-6$ , а  $N$  – любой нуклеозид), который связан непосредственно с их основной ферментативной активностью. В некоторых организмах аналогичную функцию выполняют другие ферменты, в частности, ацил-КоА-синтетаза. Надежно установлен механизм образования  $Ap_4A$  и  $Ap_3A$  на основе данных РСА для соответствующих комплексов SerRS; реакция протекает через промежуточное образование аминоксиладенилата согласно схеме:



Динуклеозидолигофосфаты выполняют функции межклеточных и внутриклеточных сигнальных молекул, связываясь с белками-рецепторами разных органов и тканей, эндотелия и крови и участвуя в регуляции процессов клеточного развития и метаболизма. Соотношение концентраций  $Ap_4A$  и  $Ap_3A$  оказывает влияние на пролиферацию и индукцию апоптоза в некоторых опухолевых клетках человека. Установление роли  $Ap_nN$  в этих процессах создает перспективу для развития новых методов терапии путем регуляции клеточного роста и апоптоза в опухолевых тканях.

Некоторые дополнительные функции синтетаз обеспечивают контроль над основной функцией. Так, благодаря взаимодействию некоторых синтетаз с белковыми факторами элонгации усиливается каталитическая эффективность реакции аминоксилации и ускоряется процесс «передачи» аминоксил-тРНК на рибосому. Установлено, что точность трансляции генетического кода, необходимая для существования жизнеспособной клетки, обеспечивается низкой частотой синтеза ошибочных продуктов аминоксилации тРНК *in vivo* – не более одной реакции на  $10^4-10^5$  правильных реакций [12]. Чтобы поддерживать такой уровень ошибок, некоторые синтетазы, недостаточно эффективно дискриминирующие между правильной и неправильными аминокислотами на стадии активации, обладают «корректирующей» функцией («editing» или «proof-reading») – катализируют гидролиз собственных ошибочных продуктов. Доказательства существования механизмов коррекции были получены в ранних работах, на основании которых Ферштом (Fersht) была предложена модель «двойного сита». Предполагалось, что активный центр действует как «крупное сито», в котором связываются изостеричные либо меньшие по размеру аминокислоты и отбраковываются аминокислоты большего размера или непохожие на «свою». Во втором, «редактирующем», центре связываются и гидролизуются продукты ошибочной активации «чужих» аминокислот или их присоединения к тРНК. Модель «двойного сита» объясняет корректирующую активность ValRS

и LeuRS, но оказалась неприменимой к MetRS, AlaRS и PheRS, которые по ошибке могут активировать аминокислоты по размеру больше специфичных (этионин, серин и тирозин соответственно). Существование гидролитического центра у ValRS, IleRS, LeuRS, ThrRS, AlaRS, ProRS и PheRS показано с помощью рентгеноструктурных исследований; этот центр сформирован отдельным структурным доменом или междоменным интерфейсом и располагается на расстоянии 30–40 Å от синтезирующего активного центра. Для синтетаз класса I характерна консервативная природа редактирующего домена, образующего вставку CP<sub>1</sub> в каталитический домен. Все синтетазы класса II различаются структурной топологией «корректирующих» доменов и их локализацией в аминокислотной последовательности. Для большинства ферментов доказано, что коррекцию проходит продукт включения «чужой» аминокислоты в тРНК, но механизм переноса акцепторного конца тРНК с присоединенным остатком аминокислоты из синтезирующего центра в гидролитический центр пока не установлен. Нарушение «корректирующей» активности синтетаз самым тесным образом связано с возникновением патологических процессов в организме. Так, случайные мутации в «editing»-домене AlaRS приводят к накоплению в нейронах белков с нарушенной глобулярной структурой, что, в свою очередь, ведет к гибели нервных клеток. Повышенное содержание аналога метионина – гомоцистеина – в плазме крови является фактором риска при сердечно-сосудистых заболеваниях, инсульте, развитии деменций и болезни Альцгеймера.

Спектр остальных функций, не связанных с основной активностью, разнообразен и зависит от специфичности и происхождения синтетаз и их клеточной локализации (табл. 1.8). Некоторые синтетазы высших эукариот секретируются и функционируют в роли сигнальных молекул, стимулирующих иммунные клетки; наиболее изучены эти функции у TyrRS и TrpRS человека. TyrRS расщепляется внеклеточной лейкоцитэластазой на два полипептида, обладающих различными активностями цитокинов. N-концевой белок мини-TyrRS обладает проангиогенной активностью, т. е. стимулирует развитие кровеносных сосудов. С-концевой белок С-TyrRS, структурно подобный домену ЕМАР-II (активирующему эндотелиальные моноциты), стимулирует хемотаксис лейкоцитов и моноцитов, накопление миелопероксидазы и фактора некроза опухоли TNF $\alpha$ , а также миграцию клеток PMN и HUVEC. Функции цитокинов отсутствуют у полноразмерной TyrRS из-за стерической блокировки соответствующих сигнальных последовательностей в трехмерной структуре. Фрагменты TrpRS, продуцируемые в результате альтернативного сплайсинга (мини-TrpRS) или протеолиза лейкоцитэластазой (T2-TrpRS), проявляют активности антиангиогенных факторов – ингибируют образование кровеносных сосудов. Имеются данные о потенциально возможном применении этой функции T2-TrpRS для цитотоксической терапии рака. LysRS человека стимулирует миграцию макрофагов и моноцитов периферической крови и продуцирование ими фактора TNF $\alpha$ . Стимулирующее влияние на клетки иммунной системы, основанное на взаимодействии с хемокиновыми рецепторами клеток, оказывают и другие синтетазы: HisRS, AsnRS и SerRS.

## Необычные функции аминоксил-тРНК-синтетаз

AaRS (класс)	Организм	Локализация в клетке	Мишень	Активность
TyrRS (I)	<i>H. sapiens</i>	внеклеточная	эндотелиал. клетки	ангиогенный цитокин
TrpRS (I)	<i>H. sapiens</i>	внеклеточная	эндотелиал. клетки	антиангиогенный цитокин
LysRS (II)	<i>H. sapiens</i>	внеклеточная	макрофаги	провоспалительный цитокин
LysRS (II)	<i>H. sapiens</i>	плазматическая мембрана	белок Gag ВИЧ	сборка вириона
GluProRS (I, II)	<i>H. sapiens</i>	цитоплазма	3'-UTR мРНК	подавление трансляции
GlnRS (I)	<i>H. sapiens</i>	цитоплазма	киназа ASK1	ингибитор апоптоза
AspRS (II)	<i>S. cerevisiae</i>	цитоплазма	мРНК	регуляция трансляции
LysRS (II)	<i>H. sapiens</i>	ядро	факторы MITF и USF2	регуляция транскрипции
MetRS (I)	<i>H. sapiens</i>	ядро	ядрышки	транскрипция рРНК
TyrRS (I)	<i>N. crassa</i>	митохондрии	интроны группы I	сплайсинг
LeuRS (I)	<i>S. cerevisiae</i>	митохондрии	интроны группы I	сплайсинг
ThrRS (II)	<i>E. coli</i>		5'-UTR мРНК	регуляция трансляции

Необычные внутриклеточные функции некоторых aaRSs проявляются в цитоплазме. Они обнаружены у двух синтетаз, входящих в состав характерного для высших эукариот мультисинтетазного комплекса (МСК), структурная организация которого описана ниже. GlnRS ингибирует апоптоз, взаимодействуя с киназой ASK1, регулирующей активность других участников апоптоза; взаимодействие GlnRS с ASK1 усиливается в присутствии глутамина. Бифункциональная GluProRS, в которой объединены в один полипептид GluRS и ProRS, подавляет экспрессию медь-содержащей плазматической оксидазы – церулоплазмина (которая участвует в гомеостазе железа и воспалительных процессах); после активации интерфероном  $\gamma$  и фосфорилирования GluProRS освобождается из состава МСК и связывается с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) мРНК в комплексе с рибосомой. Критически важным для этой активности является линкерный фрагмент, соединяющий две синтетазы. Дрожжевая AspRS образует комплекс с собственной мРНК, и для нее предполагается регуляция экспрессии гена на уровне трансляции по принципу обратной связи. Связывание AspRS с мРНК препятствует взаимодействию мРНК с рибосомой и ингибирует трансляцию; комплекс разрушается в присутствии тРНК<sup>Asp</sup>, что приводит к инициации трансляции. Таким образом, регуляция экспрессии гена определяется соотношением концентраций AspRS и тРНК<sup>Asp</sup> в клетке.

МСК включает в себя восемь синтетаз – AspRS, ArgRS, LysRS, IleRS, LeuRS, MetRS, GlnRS и GluProRS – и три мультифункциональных белка – p43, p38 и p18, называемых в некоторых работах как AIMP1, AIMP2 и AIMP3 (от англ. aaRS-interacting multifunctional protein). Все AIMP-белки выполняют свое-

образные функции в регуляции клеточного метаболизма, включая такие процессы, как стимуляция иммунных клеток, репарация ДНК и убиквитинирование белков. Трехмерная структура МСК неизвестна, но установлены взаимодействующие друг с другом компоненты с помощью таких методов, как частичная диссоциация комплекса, химические сшивки, криоэлектронная микроскопия и др. Главная роль в сборке МСК принадлежит АИМР2, который взаимодействует со всеми остальными белками. Все три АИМР прочно связаны друг с другом, и каждый из них взаимодействует с определенными синтетазами. Предполагаемые функции МСК состоят в регуляции (через ассоциацию-диссоциацию) основных и необычных активностей входящих в него синтетаз и координации процесса биосинтеза белка и сигнальных путей у высших эукариот.

Некоторые aaRSs из низших эукариот, обеспечивающие автономный биосинтез белков в митохондриях, функционируют как факторы сплайсинга интронов группы I. Впервые сплайсинг-активность была обнаружена у митохондриальной TyrRS *N. crassa*; взаимодействие фермента с двумя тРНК-подобными спиральными элементами интрона стабилизирует каталитически активную для автосплайсинга структуру. Сплайсинг-активность проявляют и другие TyrRSs из грибов подтипа *Pezizomycotina*. Сплайсинг-активность разных TyrRSs обусловлена наличием у них переменных видоспецифичных последовательностей. Дрожжевая LeuRS участвует в удалении четырех интронов группы I из двух генов. Важный для этой активности фрагмент LeuRS принадлежит домену CP<sub>1</sub>, ответственному за редактирующую функцию. Уникальное свойство митохондриальной LysRS человека – участие в сборке вириона ВИЧ-1 – обусловлено способностью фермента к образованию комплексов с капсидными белками вируса.

Многие синтетазы содержат в аминокислотной последовательности сигналы ядерной локализации и найдены в ядре, но ядерные функции большинства из них неизвестны. Дрожжевая TyrRS входит в состав сложного ядерного комплекса, ответственного за экспорт тРНК. MetRS человека транслируется в ядрышки на стадии пролиферации клеток; для этого фермента предполагается активность в биогенезе рРНК. LysRS человека участвует в регуляции процессов транскрипции в тучных клетках (иммунных клетках соединительной ткани), образуя комплекс с факторами транскрипции MITF и USF2 и раковым супрессорным белком Hint; освобождение факторов транскрипции из комплекса, ведущее к их активации, регулируется взаимодействием белка Hint с Arp4A, который синтезируется самой LysRS.

Мультифункциональность характерна и для некоторых бактериальных синтетаз. Детально изучена *in vivo* и *in vitro* регуляция экспрессии гена, кодирующего ThrRS *E. coli*, на уровне трансляции по принципу обратной связи: фермент подавляет инициацию трансляции, связываясь с 5'-нетранслируемой областью мРНК. Подобная функция обнаружена у про- и эукариотических GlnRSs. Уникальной характеристикой AlaRS *E. coli* и PheRS *T. thermophilus* является ДНК-связывающая активность. Возможность регуляции данными синтетазами собственной экспрессии на уровне транскрипции пока не доказана.

Открытие вторичных функций в разных процессах клеточного метаболизма, включая патофизиологические, способствовало установлению взаимосвязи между синтетазами и болезнями [41]. Показана причастность ряда ферментов к канцерогенезу. Так, в определенных клеточных линиях миелоидного лейкоза повышена экспрессия TyrRS и PheRS. Уровень экспрессии гена LeuRS влияет на рост и миграцию раковых клеток легких. Восемь синтетаз (специфичных к His, Thr, Ala, Gly, Asn, Phe, Ile, Tyr) являются аутоантигенами в аутоиммунном заболевании человека, известном как идиопатическая воспалительная миопатия (*idiopathic inflammatory myopathy*, ИМ) или «антисинтеазный синдром». Клинические проявления синдрома включают заболевания мышц, суставов и легких; для каждого пациента характерно присутствие aaRS-антител одного типа. Известны случаи ассоциации синдрома анти-aaRS с саркоидозом и лимфомой. Гипотетические механизмы индукции ИМ основаны на молекулярной мимикрии между инфекционными агентами и синтетазой или тРНК; прямое патогенное влияние aaRS-антител на развитие болезни не доказано.

Обнаружена корреляция между мутациями генов митохондриальных тРНК и заболеваниями человека: более 140 точечных мутаций ассоциируются с энцефалопатией, миопатией, эпилепсией, диабетом и глухотой. Отсутствие полного понимания связанных с заболеваниями молекулярных процессов затрудняет лечение. Показано, что ряд мутаций приводит к нарушениям структуры тРНК и их функциональных свойств в процессах аминокислотирования и трансляции. Повышение активности соответствующих синтетаз по отношению к мутантным тРНК (с помощью направленной модификации ферментов) рассматривается как один из подходов к созданию новых методов терапии [11].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК / Под ред. Д. Г. Кнорре М.: Наука, 1984.
2. Giege R., Puglisi J. D., Florentz C. tRNA structure and aminoacylation efficiency // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1993. Vol. 45. P. 129–206.
3. Васильева И. А., Моор Н. А. Взаимодействие аминоацил-тРНК-синтетаз с тРНК: общие закономерности и особенности узнавания высокомолекулярного субстрата (обзор) // *Биохимия.* 2007. Т. 72. С. 306–324.
4. Yuan J., Palioura S., Salazar J. C., Su D., O'Donoghue P., Hohn M.J., Cardoso A. M., Whitman W. B., Söll D. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. P. 18923–18927.
5. Jovine L., Djordjevic S., Rhodes D. The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 2.0 Å resolution: cleavage by Mg<sup>2+</sup> in 15-year old crystals // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 301. P. 401–414.
6. Shi H., Moore P. The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited // *RNA.* 2000. Vol. 6. P. 1091–1105.
7. Giegé R., Frugier M. Transfer RNA structure and identity // *Translation mechanisms / Lapointe J. and Brakier-Gingras L. Eds. Georgetown, TX: Landes Bioscience.* 2003. P. 3–26.
8. Beuning P. J., Musier-Forsyth K. Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases // *Biopolymers.* 1999. Vol. 52. P. 1–28.
9. Maglott E. J., Deo S. S., Przykorska A., Glick G. D. Conformational transitions of an unmodified tRNA: implications for RNA folding // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 16349–16359.
10. Arnez J. G., Moras D. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction // *Trends Biochem. Sci.* 1997. Vol. 22. P. 211–216.
11. Сафро М. Г., Моор Н. А. Кодазы 50 лет спустя (обзор) // *Молекуляр. Биология.* 2009. Т. 43. С. 230–242.
12. First E. A. Catalysis of the tRNA aminoacylation reaction // *The aminoacyl-tRNA synthetases / Ibba M., Francklyn C. and Cusack S. Eds. Georgetown, TX: Landes Bioscience.* 2005. P. 328–352.
13. Safo M., Moor N., Lavrik O. Phenylalanyl-tRNA synthetases // *The aminoacyl-tRNA synthetases / Ibba M., Francklyn C. and Cusack S. Eds. Georgetown, TX: Landes Bioscience.* 2005. P. 250–265.
14. McClain W. H., Gabriel K. Construction of an *Escherichia coli* knockout strain for functional analysis of tRNA<sup>Asp</sup> // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 310. P. 537–542.
15. Crothers D. M., Seno T., Söll G. Is there a discriminator site in transfer RNA? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972. Vol. 69. P. 3063–3067.
16. Sherman J. M., Thomann H. U., Söll D. Functional connectivity between tRNA binding domains in glutaminyl-tRNA synthetase // *J. Mol. Biol.* 1996. Vol. 256. P. 818–828.
17. Auld D. S., Schimmel P. Switching recognition of two tRNA synthetases with an amino acid swap in a designed peptide // *Science.* 1995. Vol. 267. P. 1994–1996.

18. Brevet A., Chen J., Commans S., Lazennec C., Blanquet S., Plateau P. Anticodon recognition in evolution: switching tRNA specificity of an aminoacyl-tRNA synthetase by site-directed peptide transplantation // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 30927–30935.
19. Feng L., Tumbula-Hansen D., Toogood H., Söll D. Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. P. 5676–5681.
20. Wakasugi K., Quinn C. L., Tao N., Schimmel P. Genetic code in evolution: switching species-specific aminoacylation with a peptide transplantant // *EMBO J.* 1998. Vol. 17. P. 297–305.
21. Jia J., Chen X.-L., Guo L.-T., Yu Y.-D., Ding J.-P., Jin Y.-X. Residues Lys-149 and Glu-153 switch the aminoacylation of tRNA<sup>Trp</sup> in *Bacillus subtilis* // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 41960–41965.
22. Lovato M. A., Swairjo M. A., Schimmel P. Positional recognition of a tRNA determinant dependent on a peptide insertion // *Mol. Cell.* 2004. Vol. 13. P. 843–851.
23. Fukai S., Nureki O., Sekine S., Shimada A., Vassylyev D. G., Yokoyama S. Mechanism of molecular interactions for tRNA<sup>Val</sup> recognition by valyl-tRNA synthetase // *RNA.* 2003. Vol. 9. P. 100–111.
24. Kobayashi T., Nureki O., Ishitani R., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S., Sakamoto K., Yokoyama S. Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion // *Nat. Struct. Biol.* 2003. Vol. 10. P. 425–432.
25. Sekine S., Nureki O., Shimada A., Vassylyev D. G., Yokoyama S. Structural basis for anticodon recognition by discriminating glutamyl-tRNA synthetase // *Nat. Struct. Biol.* 2001. Vol. 8. P. 203–206.
26. Sankaranarayanan R., Dock-Bregeon A.-C., Romby P., Caillet J., Springer M., Rees B., Ehresmann C., Ehresmann B., Moras D. The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Thr</sup> complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site // *Cell.* 1999. Vol. 97. P. 371–381.
27. Eiler S., Dock-Bregeon A.-C., Moulinier L., Thierry J.-C., Moras D. Synthesis of aspartyl-tRNA<sup>Asp</sup> in *Escherichia coli* – a snapshot of the second step // *EMBO J.* 1999. Vol. 18. P. 6532–6541.
28. Moor N., Kotik-Kogan O., Tworowski D., Sukhanova M., Safro M. The crystal structure of the ternary complex of phenylalanyl-tRNA synthetase with tRNA<sup>Phe</sup> and a phenylalanyl-adenylate analogue reveals a conformational switch of the CCA end // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45. P. 10572–10583.
29. Giegé R. Genetic code expansion // *Nat. Struct. Biol.* 2003. Vol. 10. P. 414–416.
30. Delagoutte B., Moras D., Cavarelli J. tRNA aminoacylation by arginyl-tRNA synthetase: induced conformations during substrates binding // *EMBO J.* 2000. Vol. 19. P. 5599–5610.
31. Rath V. L., Silvian L. F., Beijer B., Sproat B. S., Steitz T. A. How glutaminyl-tRNA synthetase selects glutamine // *Structure.* 1998. Vol. 6. P. 439–449.
32. Sekine S., Nureki O., Dubois D.Y., Bernier S., Chênevert R., Lapointe J., Vassylyev D. G., Yokoyama S. ATP binding by glutamyl-tRNA synthetase is

- switched to the productive mode by tRNA binding // EMBO J. 2003. Vol. 22. P. 676–688.
33. Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. The crystal structure of the ternary complex of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA<sup>Ser</sup> and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 2834–2842.
  34. Torres-Larios A., Sankaranarayanan R., Rees B., Dock-Bregeon A.-C., Moras D. Conformational movements and cooperativity upon amino acid, ATP and tRNA binding in threonyl-tRNA synthetase // J. Mol. Biol. 2003. Vol. 331. P. 201–211.
  35. Cavarelli J., Eriani G., Rees B., Ruff M., Boeglin M., Mitschler A., Martin F., Gangloff J., Thierry J.-C., Moras D. The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional aspects of the aminoacylation reaction // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 327–337.
  36. Moulinier L., Eiler S., Eriani G., Gangloff J., Thierry J.-C., Gabriel K., McClain W. H., Moras D. The structure of an AspRS-tRNA<sup>Asp</sup> complex reveals a tRNA-dependent control mechanism // EMBO J. 2001. Vol. 20. P. 5290–5301.
  37. Иванов К. А., Моор Н. А., Лаврик О. И. Необычные функции аминокил-тРНК-синтетаз // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 1047–1057.
  38. Park S. G., Ewalt K. L., Kim S. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers // Trends Biochem. Sci. 2005. Vol. 30. P. 569–574.
  39. Yang X.-L., Schimmel P., Ewalt K. L. Relationship of two human tRNA synthetases used in cell signaling // Trends Biochem. Sci. 2004. Vol. 29. P. 250–256.
  40. Park S. G., Choi E.-C., Kim S. Aminoacyl-tRNA synthetase interacting multifunctional proteins (AIMPs): a triad for cellular homeostasis // IUBMB Life. 2010. Vol. 62. P. 296–302.
  41. Kron M., Härtle M. Aminoacyl-tRNA synthetases and disease // The Aminoacyl-tRNA Synthetases / Ibba M., Francklyn C. and Cusack S. Eds. Georgetown, TX: Landes Bioscience. 2005. P. 328–352.

## ЧАСТЬ II РИБСОМА И БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

### Глава 1. Этапы трансляции

Основными этапами трансляции на рибосомах являются инициация, элонгация и терминация синтеза полипептидной цепи. *Инициация* включает в себя последовательность событий, приводящих к образованию комплекса рибосомы с мРНК и инициаторной метионил-тРНК (у бактерий – формилметионил-тРНК), готового к синтезу первой пептидной связи. В процессе *элонгации* происходит последовательное удлинение пептидной цепи, каждый цикл элонгации удлиняет цепь на один аминокислотный остаток. При *терминации* трансляции включается механизм, приводящий к отсоединению синтезированной полипептидной цепи от тРНК и выходу ее из рибосомы.

#### 1.1. Основные участники синтеза белка на рибосоме

Участниками синтеза белка на рибосоме являются мРНК, несущие генетическую информацию, аминоацил-тРНК (aa-тРНК), поставляющие материал для синтеза полипептидной цепи, и белковые факторы трансляции, которые дирижируют процессом, непосредственно участвуя в нем.

*мРНК* представляет собой одноцепочечный полинуклеотид, который принято читать и писать от 5'-конца к 3'-концу; именно в этом направлении рибосома читает мРНК. Почти все мРНК начинаются с 5'-нетранслируемой последовательности (НТП), после которой следует инициаторный (стартовый) триплет AUG (гораздо реже – GUG), а затем – последовательность, кодирующая полипептидную цепь синтезируемого белка в соответствии с генетическим кодом, т. е. каждый тринуклеотид этой последовательности соответствует определенному аминокислотному остатку. Кодирующая часть мРНК заканчивается «стоп»-кодоном, после которого следует 3'-НТП. Наряду с этими чертами, общими для мРНК всех организмов, мРНК бактерий и вирусов имеют характерные особенности, отличающие их от мРНК эукариот. Так, большинство *мРНК бактерий* перед старт-кодоном (на расстоянии от 3 до 10 нуклеотидов от него) содержат так называемые последовательности Шайна-Далгарно (ШД, или в английской транскрипции SD), богатые пуринами и частично комплементарные пиридин-богатым 3'-концевым последовательностям рРНК малых субчастиц (...GAUCACCUCCUUA<sub>OH</sub> у *E.coli*). Кроме того, мРНК бактерий (а также геномные РНК вирусов) обычно содержат не одну, а несколько кодирующих последовательностей (*цистронов*), соответствующих разным белкам и разделенных некодирующими последовательностями; эти мРНК называют *полицистронными* (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Схема строения полицистронной мРНК эубактерий и вирусов

мРНК эукариот не содержат последовательностей ШД и являются одноцистронными, т. е. включают в себя единственную кодирующую последовательность. Другими отличиями мРНК эукариот является присутствие на 5'-конце очень специфичной структуры, называемой кэпом (от англ. cap – «колпачок») (рис. 2.2) и поли(А)-последовательности на 3'-конце.

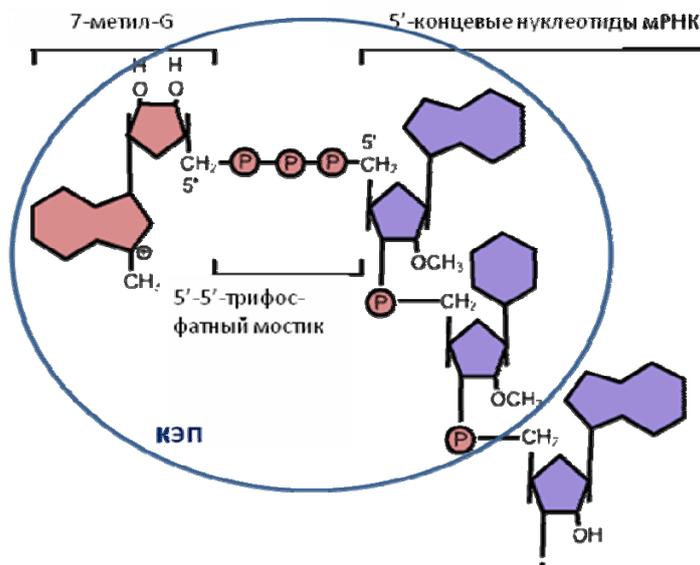


Рис. 2.2. Кэп-структура в составе мРНК

тРНК прокариот и эукариот очень похожи друг на друга по длине (обычно 76 нуклеотидов), вторичной и третичной структуре. Еще в начале 90-х годов XX века было показано, что *in vitro* рибосомы человека одинаково хорошо связывают тРНК<sup>Phe</sup> человека и *E. coli* [1]. Особняком стоят инициаторные тРНК, несколько отличающиеся от всех остальных по вторичной структуре. И у прокариот, и у эукариот инициаторные тРНК аминоацилируются только остатками метионина. Эти тРНК «работают» только на стадии инициации: остатки Met для встраивания в синтезируемую полипептидную цепь (кроме самого первого) переносит «обычная» метиониновая тРНК, похожая на все остальные. Отличительная особенность *прокариотической* инициаторной тРНК состоит в том, что она формилируется по N-концевой аминогруппе остатка Met специальными ферментами.

*Факторы трансляции* представляют собой одно- или многосубъединичные белки, подразделяющиеся на факторы инициации (IF), факторы элонгации (EF) и факторы терминации (RF от англ. releasing factor – «фактор освобождения синтезированного полипептида из рибосомы»). Внутри групп каждый фактор дополнительно обозначается цифрами или буквами, следующими после сокращения IF, EF или RF. Перед названиями соответствующих факторов эукариот ставят букву «е» (eukaryotic), например, eIF2.

## 1.2. Инициация

В процессах инициации белкового синтеза у прокариот и эукариот есть много существенных отличий; у эукариот инициация значительно усложнена, по сравнению с прокариотами, и в ней принимает участие намного большее число факторов [2]. Последнее имеет значение для регуляции белкового синтеза, которая у эукариот может осуществляться через воздействие клеточных сигналов на определенные факторы инициации (подробнее об этом – ниже). Последовательность событий при инициации трансляции у прокариот и эукариот представлена на рис. 2.3. Этот процесс в обоих случаях начинается на изолированной малой субчастице рибосомы (у прокариот – на 30S субчастице, у эукариот – на 40S субчастице).

У прокариот всего 3 фактора инициации – IF1, IF2 и IF3. На первой стадии инициации все они (IF2 – в комплексе с GTP) связываются со свободной 30S субчастицей (которая образуется в результате диссоциации рибосомы на субчастицы после терминации трансляции, см. п. 1.4). После этого субчастица связывает мРНК, при этом взаимодействие последовательности Шайна-Далгарно с соответствующим 3'-концевым фрагментом 16S рРНК способствует «правильному» расположению мРНК на субчастице, необходимому для начала инициации. Затем происходит связывание инициаторной fMet-тРНК, которая узнает кодон AUG, и образуется предынициаторный комплекс, где fMet-тРНК с кодоном AUG оказываются в пептидилном тРНК-связывающем участке (Р-участке) субчастицы. В этом комплексе один из фрагментов фактора IF3 «отворачивается» от 30S субчастицы и освобождает место для присоединения большой (50S) субчастицы, в результате чего образуется 70S комплекс инициации. После этого происходит гидролиз GTP под действием IF2, что, в свою очередь, вызывает изменения конформации комплекса, приводящее к уходу всех факторов из рибосомы (IF2 уходит в комплексе с GDP). На этом инициация заканчивается, и получается тройной комплекс рибосомы с мРНК и fMet-тРНК в Р-участке, готовый к приему в аминокислотный тРНК-связывающий участок (А-участок) aa-тРНК, соответствующей триплету мРНК, следующему за кодоном AUG (70S комплекс инициации). Следует отметить, что последовательности Шайна-Далгарно есть не во всех мРНК прокариот. Правильной посадке на рибосоме при инициации трансляции тех мРНК, у которых нет этих последовательностей, способствует рибосомный белок S1.

У эукариот, как и у прокариот, свободная малая рибосомная субчастица образуется также в результате диссоциации рибосом после терминации

трансляции. Субчастица связывает факторы eIF1, eIF1A и eIF3; затем инициаторная Met-тРНК поступает на 40S субчастицу в виде тройного комплекса с eIF2 и GTP. Кэп-связывающий белок (фактор eIF4E) специфично узнает структуру кэпа, а поли(А)-связывающий белок (РАВР, от англ. poly(A) binding protein) связывается с поли(А)-хвостом мРНК; фактор eIF4G связывается одновременно с eIF4E, РАВР, мРНК и eIF4A, который расплетает вторичную структуру мРНК в районе 5'-конца, используя энергию гидролиза АТФ, т. е. является АТФ-зависимой хеликазой. Рибосомный комплекс связывается с 5'-районом мРНК, при этом взаимодействие между eIF4G и РАВР «закольцовывает» 5'-конец мРНК с ее 3'-концевым районом. В образующемся 48S комплексе 40S субчастица движется вдоль мРНК (сканирует ее) до тех пор, пока не узнает стартовый кодон AUG. После узнавания старт-кодона комплекс связывает eIF5, который запускает гидролиз GTP, в результате чего происходит диссоциация из комплекса eIF2 в комплексе с GDP и самого eIF5. Затем происходит последняя стадия инициации – связывание eIF5B в комплексе с GTP и большой (60S) субчастицей. В составе этого комплекса происходит гидролиз GTP, в результате чего все оставшиеся факторы инициации покидают рибосому, образуется 80S комплекс инициации, полностью аналогичный соответствующему 70S комплексу прокариот. Поскольку eIF2 в процессе инициации уходит с рибосомы в виде прочного комплекса с GDP, для повторного использования фактора в следующей инициации необходимо заменить GDP в комплексе на GTP; эту функцию выполняет фактор eIF2B.

### 1.2.1. Регуляция трансляции на стадии инициации

Одним из механизмов регуляции трансляции является дискриминация мРНК по эффективности их трансляции («сильные» и «слабые» мРНК). У бактерий «сила» мРНК обычно зависит от ее сродства к 30S субчастицам, а у эукариот – от сродства 5'-НТО к факторам инициации. Другим механизмом является подавление трансляции белком-репрессором, который связывается с определенным фрагментом 5'-НТО и тем самым мешает посадке малых субчастиц или их движению в процессе поиска старт-кодона. Часто репрессором является сам белок, кодируемый мРНК, – *регуляция по принципу обратной связи*. Если репрессором является специальный белок, то в клетке должен быть эффектор, лишаящий репрессор способности связываться с мРНК.

Многие процессы регуляции белкового синтеза на стадии инициации в клетках эукариот происходят посредством специфического фосфорилирования факторов инициации по определенному аминокислотному остатку Ser или Thr с помощью специальных протеинкиназ. Последние, в свою очередь, активируются в специальных условиях (например, тепловой шок, голодание и т. п.). Примером такой регуляции является фосфорилирование eIF2, в результате которого фактор теряет способность к регенерации GTP (иными словами, eIF2B не может заменять GDP на GTP в комплексе с eIF2), что приводит к тотальной репрессии трансляции в клетке.

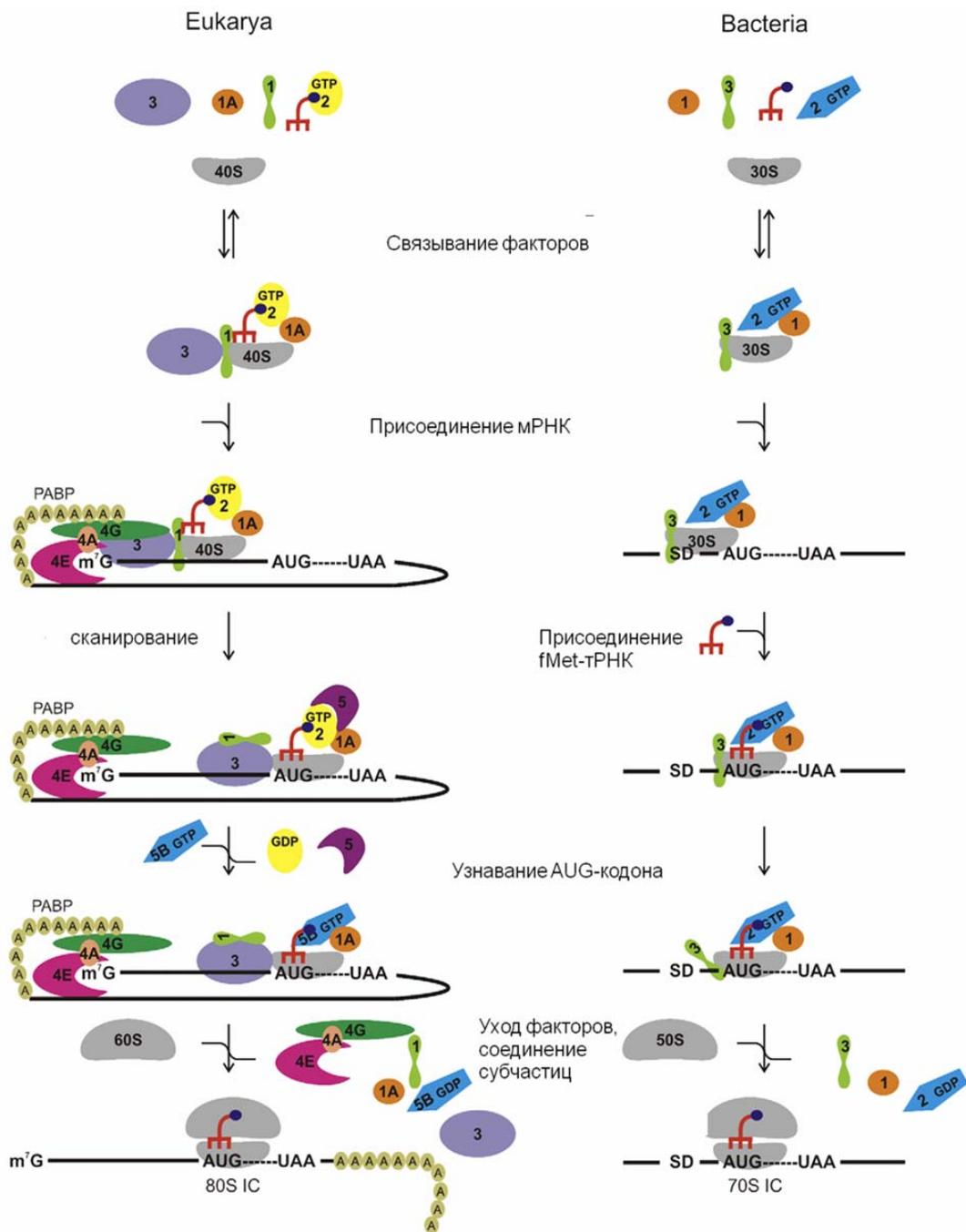


Рис. 2.3. Схема инициации у прокариот (Bacteria) и эукариот (Eukarya) [2]. Факторы инициации представлены в виде цветных фигур, обозначения «eIF» «IF» опущены. SD, последовательность Шайна-Далгарно; IC – комплекс инициации (от англ. Initiation Complex). Гомологичные факторы инициации прокариот и эукариот представлены фигурами одинаковой формы и цвета



опаснейших патогенов человека, поражающего ежегодно десятки миллионов человек в мире), а на рис. 2.5 – детальная схема внутренней инициации трансляции этой РНК. В исследованиях, проведенных в группах Дж. Пуглиси (США) и Г. Г. Карповой (Новосибирск), показано, что данный IRES при связывании с 40S субчастицами взаимодействует практически только с рибосомными белками. В лаборатории Г. Г. Карповой удалось определить белки, соседствующие с теми фрагментами IRES, которые отвечают за его связывание с 40S субчастицей [5]. Структурные элементы IRES, важные для его связывания с 40S субчастицей, были установлены различными способами. Впервые это было сделано на основании сравнительного анализа сродства к субчастице «мутантных» IRES, содержащих делеции различных фрагментов вторичной структуры [3].

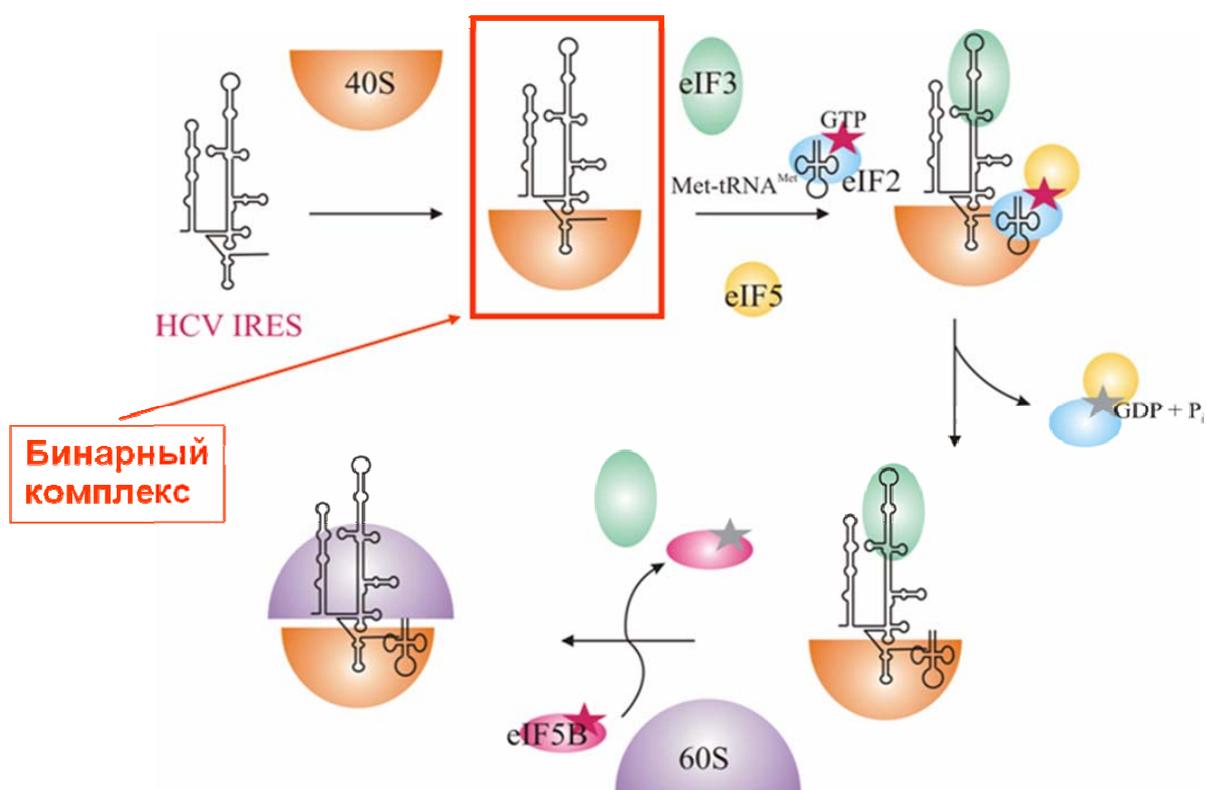


Рис. 2.5. Схема инициации трансляции РНК вируса гепатита С (HCV от hepatitis C virus)

### 1.3. Элонгация

Удлинение растущей полипептидной цепи на один аминокислотный остаток происходит в результате повторяющихся циклов элонгации. Последовательность событий в цикле элонгации у прокариот и эукариот практически одинакова; в нем принимают участие два фактора элонгации [2] (рис. 2.6). На рибосоме в цикле элонгации задействованы 3 участка (А, Р и Е) для связывания молекул тРНК и соответствующих кодонов мРНК. В начале первого цикла элонгации в Р-

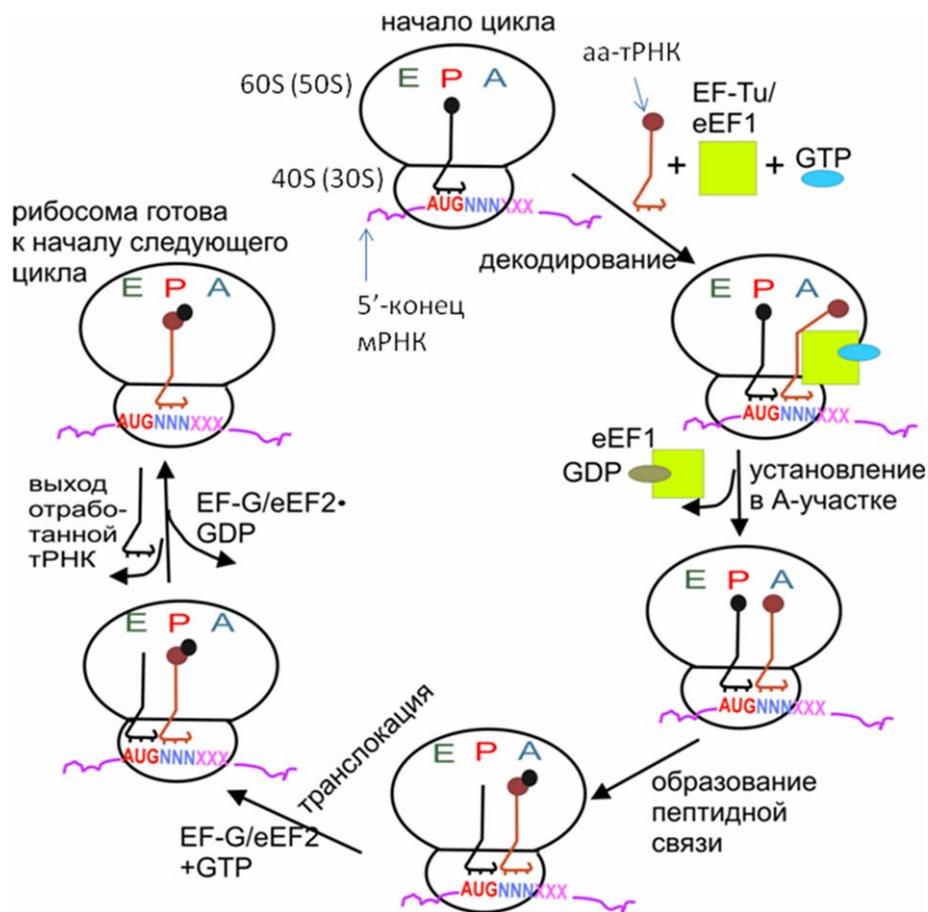


Рис. 2.6. Схема цикла элонгации (для примера приведен первый цикл после инициации). Верхняя часть L-образных молекул тРНК – 3'-конец, присоединенный к нему аминокислотный остаток изображен в виде кружка; нижняя часть – антикодон (три черточки)

участке находится инициаторная тРНК и кодон AUG (см. выше), а в начале последующих циклов элонгации – пептидил-тРНК (тРНК с растущей полипептидной цепью); А-участок предназначен для вновь поступающей аа-тРНК, кодон которой перед началом цикла устанавливается в этом участке; Е (от англ. exit – «выход») –участок связывания отработанной деацилированной тРНК перед ее выходом из рибосомы. Аа-тРНК поступает в А-участок в виде тройного комплекса с GTP и фактором EF-Tu (у эукариот – eEF-1A). Связывание тройного комплекса с рибосомой обратимо, но когда на рибосому попадает комплекс с аа-тРНК, соответствующей согласно генетическому коду кодону, находящемуся в А-участке, то на малой субчастице происходит *декодирование*. тРНК своим антикодоном узнает «родственный» кодон на малой субчастице, это вызывает изменение конформации рибосомного комплекса, передающееся от области декодирующего центра на малой субчастице на большую субчастицу, где происходит активация GTP-азной активности фактора и гидролиз GTP до GDP и неорганического фосфата. В результате фактор в комплексе с GDP покидает рибосому, а аа-тРНК устанавливается в А-участке «правильным» образом, так, что ее 3'-конец с аминокислотным остатком попадает в пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) и может участвовать в образовании пептидной связи с пептидил-

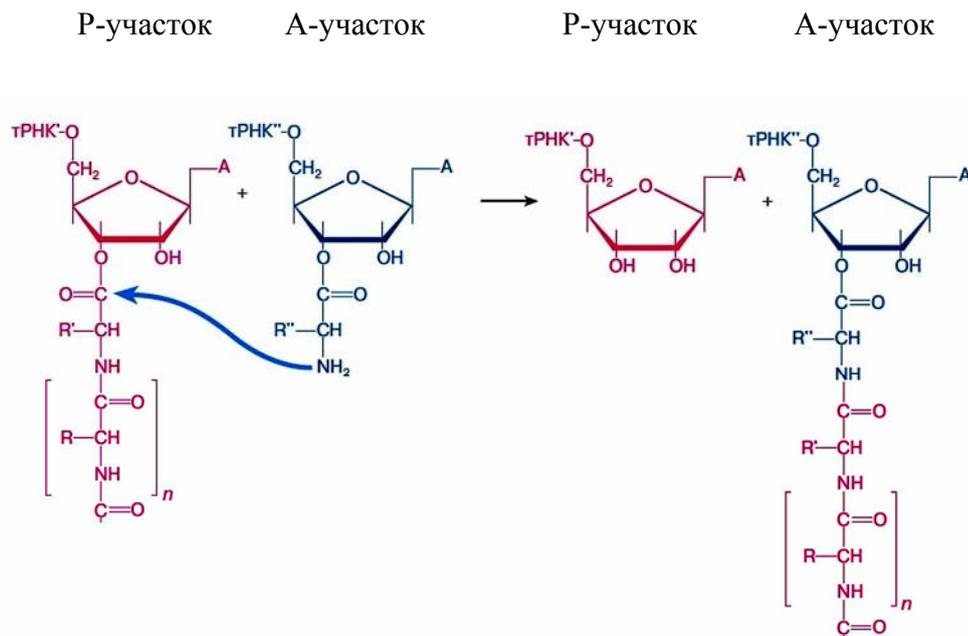


Рис. 2.7. Схема образования пептидной связи на рибосоме

tРНК [или инициаторной (f)Met-tРНК], находящейся в Р-участке. В ПТЦ на большой субчастице рибосомы происходит катализ *образования пептидной связи* (рис. 2.7), в результате чего пептид, удлинившийся на одно звено, оказывается присоединенным к tРНК в А-участке, а деацилированная tРНК остается в Р-участке. После этого под действием фактора EF-G (у эукариот – eEF-2) в комплексе с GTP происходит *транслокация* – перемещение пептидил-tРНК и соответствующего кодона мРНК из А-участка в Р, а деацилированной tРНК и соответствующего кодона – из Р-участка в Е; наконец, происходит гидролиз GTP, EF-G (eEF-2) в комплексе с GDP и деацилированная tРНК покидают рибосому, и она готова к следующему циклу элонгации. Замена GDP на GTP в комплексе с фактором EF-Tu для того, чтобы он мог вновь связывать aa-tРНК и участвовать в следующем цикле элонгации, происходит с участием фактора EF-Ts у прокариот или eEF-1В у эукариот. Несмотря на сходные функции факторов EF-Ts и eEF-1В, их аминокислотные последовательности негомологичны, более того, EF-Ts состоит из одной полипептидной цепи, а eEF-1В – из двух (у дрожжей – из трех). Факторы EF-Tu и eEF-1А, хотя и выполняют сходную функцию, не могут заменять друг друга: бактериальный фактор не работает на рибосомах эукариот, а эукариотический – на рибосомах прокариот.

#### 1.4. Терминация

Элонгация прекращается, когда в декодирующем центре рибосомы оказывается один из трех «бессмысленных» триплетов мРНК («стоп»-кодонов) UAA, UAG или UGA. В этом случае в А-участке вместо тройного комплекса aa-tРНК с GTP и фактором элонгации EF-Tu/eEF-1А связывается фактор терминации трансляции 1-го класса, узнающий стоп-кодон на рибосоме и

запускающий гидролиз сложноэфирной связи между пептидным остатком и молекулой тРНК в Р-участке рибосомы (освобождение синтезированного полипептида). Это односубъединичный белок, пространственная структура которого напоминает структуру тРНК. Связываясь с рибосомой, он одним своим фрагментом, напоминающим антикодонную шпильку тРНК, узнает стоп-кодон, а другой его фрагмент, похожий на акцепторный конец, оказывается в пептидилтрансферазном центре. У эукариот все три стоп-кодона узнает единственный фактор eRF1 (RF от англ. Releasing factor); у прокариот есть два подобных фактора: RF1 узнает кодоны UAA и UAG, а RF2 – кодоны UAA и UGA. Аминокислотные последовательности факторов прокариот и эукариот имеют очень мало сходства, но короткие аминокислотные последовательности, отвечающие за узнавание остатка U стоп-кодона (мотив NIKS в N-концевом домене) и за запуск гидролиза пептидил-тРНК (мотив GGQ в центральном домене), практически одинаковы у всех организмов. Кроме RF1/2 (eRF1), в терминеции участвует фактор RF3 (у эукариот eRF3) – активируемая рибосомой ГТРаза. Общая упрощенная схема терминеции представлена на рис. 2.8.

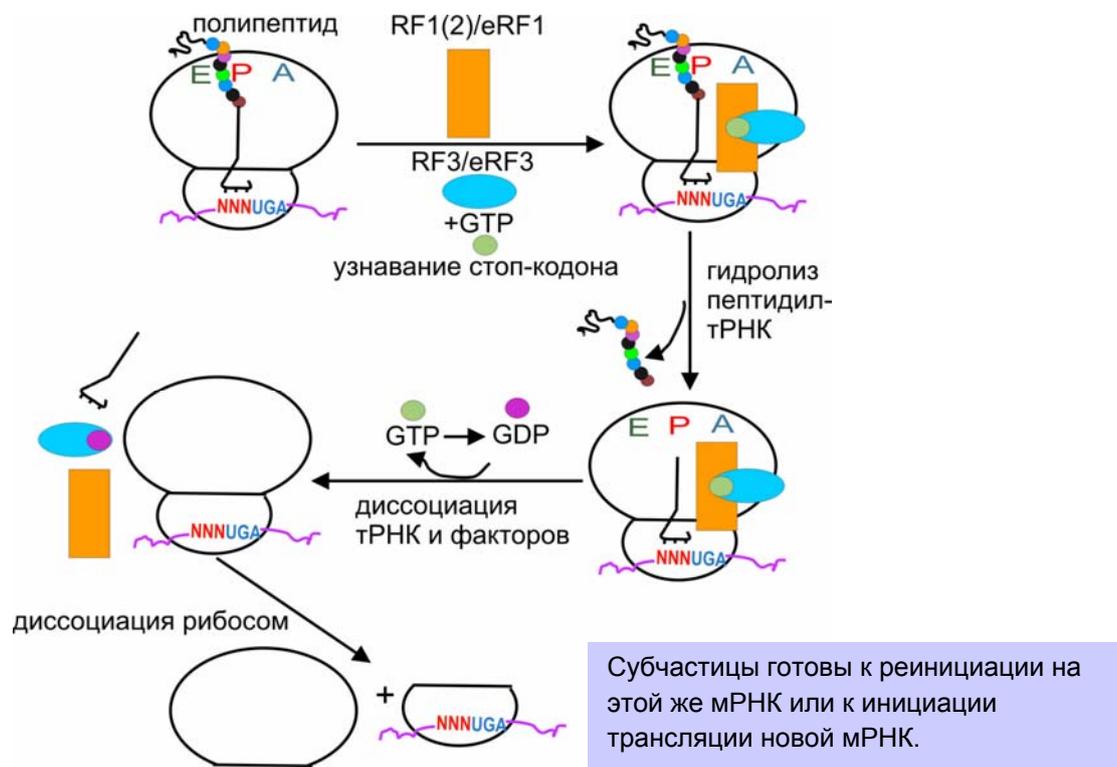


Рис. 2.8. Упрощенная схема терминеции трансляции

Однако в механизмах терминеции у прокариот и эукариот имеются принципиальные различия [2]. Характерные особенности терминеции у *прокариот* состоят в следующем:

- 1) освобождение синтезированного полипептида происходит до гидролиза ГТФ и без участия RF3;
- 2) гидролиз ГТФ необходим для диссоциации RF3 с рибосомы;

3) посттерминационный комплекс рибосом, содержащий RF1/RF2, выступает в роли фактора, обменивающего GDP на GTP в комплексе с RF3.

4) RF3 не требуется для гидролиза пептидил-тРНК; вообще клетка может существовать и без этого фактора.

У эукариот главная особенность терминации состоит в том, что оба фактора терминации действуют кооперативно и скоординированно:

1) eRF1 имеет высокое сродство к eRF3, и оба фактора, скорее всего, образуют комплекс перед тем, как попасть на рибосому;

2) гидролиз GTP фактором eRF3 необходим для быстрого и эффективного гидролиза пептидил-тРНК фактором eRF1.

Гидролиз GTP приводит к изменению конформации терминационного комплекса таким образом, что универсальная для всех организмов последовательность GGQ фактора eRF1, отвечающая за индукцию гидролиза пептидил-тРНК, оказывается в пептидилтрансферном центре рибосомы.

После окончания терминации трансляции происходит *рециклинг*, включающий диссоциацию мРНК и деацелированной тРНК и последующую диссоциацию рибосом на субчастицы, которые затем снова участвуют в процессе трансляции. У прокариот есть специальный фактор рециклинга RRF (от англ. Ribosome recycling factor), который, действуя совместно с EF-G, диссоциирует рибосому на субчастицы. мРНК, которая может оставаться связанной с изолированной 30S субчастицей, удаляется из нее фактором инициации IF3.

У эукариот и архей специализированного фактора рециклинга рибосом пока не нашли. Диссоциация 80S рибосом эукариот на субчастицы после завершения терминации трансляции происходит при участии факторов инициации eIF3 и eIF6; диссоциацию мРНК с 40S субчастицы вызывает фактор eIF3j, а диссоциацию тРНК – фактор eIF1.

#### 1.4.1. Прочтение стоп-кодона в качестве смыслового

В дополнение к 20 обычным аминокислотам, входящим в состав всех белков, существует 21-я аминокислота – селеноцистеин (биологическая форма селена), отличающаяся от цистеина тем, что вместо атома серы содержит атом селена. Эта аминокислота входит в состав очень небольшого числа белков – селенопротеинов (у человека их всего 25, пока известны функции только некоторых из них). Несмотря на то, что селенопротеины составляют ничтожно малую долю белков, они важны для нормального функционирования организма, и дефицит селена приводит к тяжелым аномалиям, в частности, связанным с нарушениями функций мышц у млекопитающих. Среди селенопротеинов с известными функциями есть антиоксиданты и регуляторы окислительно-восстановительного статуса клетки, защищающие ее от окислителей (например, глутатионпероксидаза и деиодиназы). Группа Se-H, которая ионизируется в физиологических условиях намного сильнее, чем S-H, играет принципиально важную роль в каталитических центрах соответствующих ферментов.

Селеноцистеин (Sec) кодируется триплетом UGA, обычно являющимся стоп-кодоном. В 3'-нетранслируемой области мРНК млекопитающих, кодирующих селенопротеины, существует специальный структурный элемент в форме шпильки – SECIS (от англ. Selenocysteine Insertion Sequence), который вместе с рядом белковых факторов отвечает за прочтение триплета UGA в качестве селеноцистеинового кодона [6] (рис. 2.9). SECIS может находиться на расстоянии в несколько сотен нуклеотидов от стоп-кодона. Два белка, играющие ключевую роль в этом процессе, уже найдены – это специальный фактор элонгации EF-Sec, доставляющий Sec-тРНК в А-участок рибосомы – аналог фактора EF-Tu/EF1A, и SECIS-связывающий белок SBP2, механизм действия которого пока до конца не установлен. Известно лишь, что он связывается с большой субчастицей, и установлено, что за это связывание отвечает короткий фрагмент, который у белка млекопитающих находится в положениях 525-540.

Кроме селенопротеиновых мРНК, известны и другие случаи прочтения стоп-кодонов в качестве смысловых. В некоторых организмах, относящихся к примитивным эукариотам – силиатам (инфузории и т. п.), свойства стоп-кодона проявляют не три триплета UAA, UGA и UAG, а только один или два из них (какие именно – зависит от организма) (см., например, [7]). Так, у *Stylonychia* и *Paramecium* стоп-кодом является только триплет UGA, тогда как триплеты UAA и UAG кодируют глутамин. Установлено, что причиной «неузнавания» триплетов в качестве стоп-кодона являются аминокислотные последовательности в факторе терминации eRF1 силиатов, отвечающие за распознавание пуринов стоп-кодона. У всех «нормальных» эукариот эти последовательности одинаковы и узнают любой пурин во втором или третьем положении стоп-кодона, а у силиатов они изменены так, что eRF1 способен узнавать только один тип пурина в определенном положении стоп-кодона (например, у *Stylonychia* и *Paramecium* eRF1 узнает только G во втором положении).

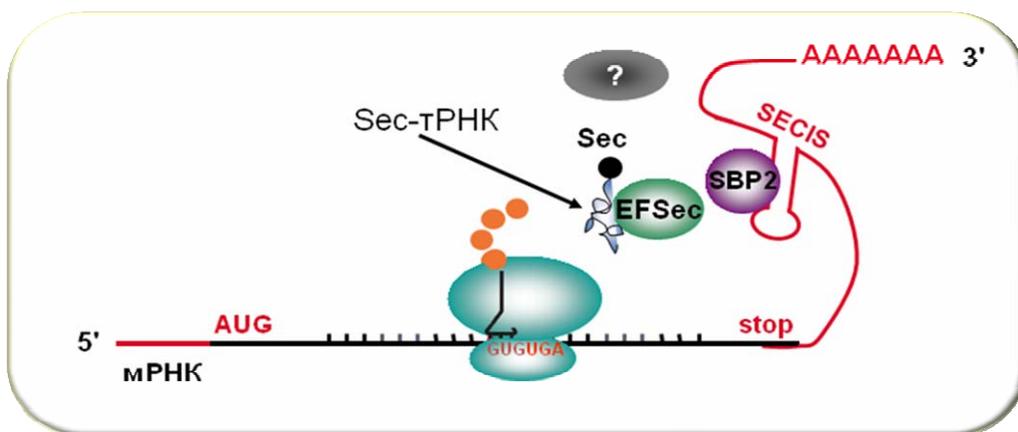


Рис. 2.9. Упрощенная схема включения остатка селеноцистеина в полипептидную цепь

## 1.5. Выход синтезированного полипептида из рибосомы

Синтезируемый на рибосоме полипептид выходит в цитоплазму через мембрану эндоплазматического ретикула или интегрируется в мембрану. Транслирующую рибосому направляет на мембрану так называемая сигналузнающая частица SRP (signal recognition particle), которая распознает специальную сигнальную последовательность в синтезируемом полипептиде, как только эта последовательность появляется на выходе из рибосомы. Связываясь с этой последовательностью, SRP вызывает паузу в элонгации, во время которой рибосома закрепляется своей большой субчастицей на специальном рецепторе для SRP на мембране, после чего SRP способствует транслокации (перемещению) полипептида через мембрану. SRP является эволюционно консервативным рибонуклеопротеидом, состоящим из 7S РНК (в прокариотах 4.5S рРНК) и нескольких белков.

Для транслокации полипептида в эндоплазматический ретикулум (ЭР) в мембране есть специальный трансмембранный канал, образованный кольцеобразной олигомерной белковой структурой, состоящей из трех или четырех частиц так называемого «SecYEG-комплекса», содержащего  $\alpha$ -субъединицу с десятью трансмембранными (ТМ)-доменами и две меньшие  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы, в каждую из которых входит по одному трансмембранному домену. Эта кольцеобразная структура, которую иногда называют «транслоконом», эволюционно консервативна (в прокариотах соответствующий комплекс называется SecYEG или SecY) и непосредственно связывается с рибосомой, в результате чего формируется путь, по которому синтезированный полипептид транслоцируется из рибосомы в ЭР. Строение комплексов рибосом с SRP и транслоконами расшифрованы с помощью крио-электронной микроскопии (см. п. 4.2, в качестве примера см. рис. 2.10).

## Глава 2. Структура рибосомы

Масса рибосомы состоит в основном из белков и рРНК; у прокариот на белки приходится примерно 1/3 массы, а в рибосомах эукариот – около половины. Набор белков и рРНК в рибосомной субчастице одинаков в пределах каждого из царств. Кроме белков и рРНК, в состав субчастиц входят катионы  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  и полиамины – спермин, путресцин и спермидин. Содержание и качественный состав полиаминов в рибосомных субчастицах сильно зависит от природы организма и типа ткани. Основные характеристики рибосом прокариот и эукариот приведены в табл. 2.1 и на рис. 2.11.

Таблица 2.1

### Основные характеристики рибосом

Параметр	Рибосома		Малая субчастица		Большая субчастица	
	прокариоты	эукариоты	прокариоты	эукариоты	прокариоты	эукариоты
Коэффициент седиментации	70S	80S	30S	40S	50S	60S
Масса, кДа	3000	4000-5000	1000	1200-1500	2000	2800-3500

Уже к 1980-м гг. с помощью электронной микроскопии были выявлены основные морфологические черты субчастиц рибосом прокариот и эукариот и обнаружено, что они в значительной степени схожи. Так, малая субчастица подразделяется на «голову» (head) с «клювом» (beak), которые отделены «шеей» (neck) от тела (body) с платформой (platform); большая субчастица имеет наверху «центральный выступ» (central protuberance) и два боковых стержня (stalks) по разные стороны от него. Существенный вклад в изучение строения рибосомы с помощью электронной микроскопии внес академик А. С. Спирин и его коллеги из Института белка РАН (г. Пущино).

Использование крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) в начале XXI века позволило увидеть множество более тонких деталей (рис. 2.11). Подробнее об этом методе будет рассказано в п. 4.2.

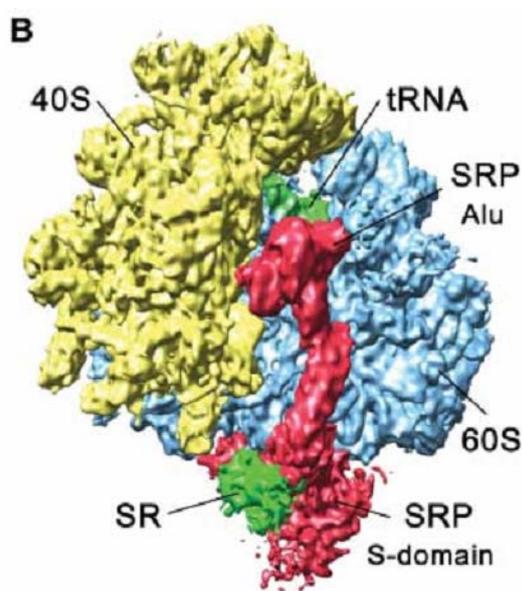


Рис. 2.10. Крио-электронное изображение комплекса транслирующей эукариотической рибосомы с SRP [8]. На изображении обозначены субчастицы, тРНК (tRNA), SRP и белок-рецептор SR, способствующий переносу рибосомы на транслокон. Сигнальная последовательность синтезированного полипептида на этом изображении закрыта центральной частью S-домена SRP

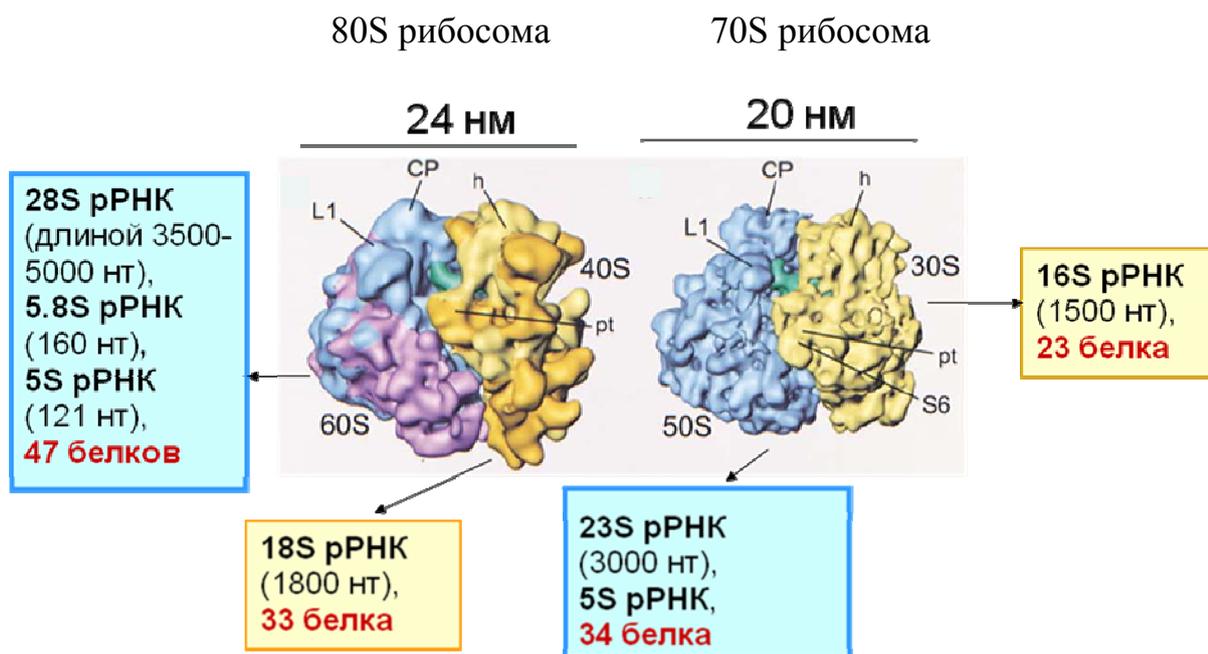


Рис. 2.11. Состав рибосомных субчастиц и изображения рибосом бактерии *Escherichia coli* (слева) и эукариот *Saccharomyces cerevisiae* (справа), полученные с помощью крио-ЭМ (буквы обозначают элементы структуры субчастиц) [9]

На малой субчастице рибосомы расположен мРНК-связывающий центр и участок декодирования; на большой – каталитический центр, где происходит образование пептидной связи (пептидилтрансферазный центр, ПТЦ), туннель для синтезируемого полипептида, а также участки взаимодействия с мембраной эндоплазматического ретикулума (в случае рибосом эукариот) и сигнализующей частицей. Участки связывания тРНК – А, Р и Е-участки – образованы контактными поверхностями большой и малой субчастиц (поверхностями взаимного контакта субчастиц), что позволяет антикодонам тРНК взаимодействовать с мРНК в декодирующем центре малой субчастицы, а акцепторным концам с аминокислотными остатками находиться в области ПТЦ. Структуры гомологичных субчастиц и рибосом у всех бактерий очень сходны; у эукариот это сходство прослеживается от низших – дрожжей и других грибов – до растений и высших эукариот (млекопитающих). Структура рибосомы зависит от ее функционального состояния и может существенно меняться в процессе ее функционирования. Так, в процессе цикла элонгации «голова» малой субчастицы поворачивается относительно «тела» (движения, подобное храповику, от англ. ratchet-like movement).

По своей структуре рибосома эукариот в значительной степени сохраняет черты сходства с рибосомой прокариот, но ее не следует рассматривать просто как увеличенную копию прокариотической рибосомы, поскольку рибосома

эукариот имеет присущие только ей особенности (подробнее – в следующих разделах).

## 2.1. рРНК

Каждая из рибосомных субчастиц содержит по одной молекуле высокомолекулярной рРНК. В 40S субчастице эукариот это 18S рРНК (длиной от 1798 нуклеотидов у дрожжей до 1869 нуклеотидов у человека), а 30S субчастице бактерий – гомологичная ей 16S рРНК длиной около 1500 нуклеотидов. Большая (50S) субчастица бактерий содержит 23S рРНК длиной около 2900 нуклеотидов; размер гомологичной ей рРНК в 60S субчастице эукариот значительно увеличивается от низших эукариот к высшим. Так, рРНК дрожжей имеет коэффициент седиментации 25-26S и длину 3392 нуклеотида, а рРНК высших эукариот имеет коэффициент седиментации 28S и ее длина достигает 5025 нуклеотидов у человека. Кроме высокомолекулярной рРНК, 50S и 60S субчастицы содержат 5S рРНК длиной 120 нуклеотидов, а 60S также 5.8S рРНК длиной 160 нуклеотидов, причем последняя гомологична 5'-концевой части 23S рРНК бактерий и образует прочный комплекс с 28S рРНК.

рРНК содержат довольно много метилированных (в большинстве случаев по 2'-оксигруппам рибозы) нуклеотидов и остатков псевдоуридина. Так, рРНК позвоночных содержат 95 остатков псевдоуридина и 115 метилированных нуклеотидов, а рРНК дрожжей – 65 остатков псевдоуридина и 45 метилированных нуклеотидов. Все метилированные нуклеотиды находятся в эволюционно консервативной части рРНК; 2'-О-метилирование, по-видимому, играет важную роль в образовании зрелой рибосомы, а метилирование оснований 18S рРНК – в транспорте малой субчастицы из ядра в цитоплазму.

### 2.1.1. Вторичная структура рРНК

Последовательности рРНК представляют собой мозаику из эволюционно консервативных и переменных участков. Еще в начале 1980-х гг. были проведены расчеты вторичной структуры рРНК, основанные на сравнительном анализе различных рРНК. Эти расчеты позволили обнаружить «кор» («сердцевину»), универсальный для рРНК всех трех царств жизни; оказалось, что «кор» охватывает не только консервативные районы нуклеотидной последовательности рРНК, но и часть переменных участков, вовлекая большую часть (60–70 %) нуклеотидов рРНК (рис. 2.12). Универсальные элементы вторичной структуры рРНК во многих местах прерываются переменными элементами, которые в настоящее время наиболее принято

называть «сегментами экспансии» (expansion segments, ES). Этот термин отражает увеличенный (от англ. expanded) размер этих областей в рРНК большой и малой субчастиц различных организмов, по сравнению с соответствующей рРНК *E. coli*. Сегменты экспансии прерывают универсальную вторичную структуру в одних и тех же местах в гомологичных рРНК всех царств, но сами являются чрезвычайно вариабельными – их размеры и первичная структура могут различаться даже у разных организмов одного и того же вида. Ниже в качестве примера приведена вторичная структура рРНК малых рибосомных субчастиц, на которой показаны консервативный «кор» и сегменты экспансии.

### **2.1.2. Роль рРНК в структурной организации и функционировании рибосом**

рРНК играет основополагающую роль в структурной организации и функционировании рибосом. Доказано, что ключевые функциональные центры прокариотической рибосомы – декодирующий и пептидилтрансферазный – образованы практически только рибосомными РНК. Считается, что это верно и для рибосом эукариот, поскольку центры рибосом прокариот образованы наиболее эволюционно консервативными фрагментами структуры рРНК. О том, какие функции выполняют сегменты экспансии в рРНК эукариот, до сих пор известно довольно мало. Следует полагать, что видо- или родоспецифичные сегменты экспансии имеют функции, специфичные для данного вида или рода.

Выявление главенствующей роли рРНК в функционировании рибосом привело в конце XX века к появлению популярной гипотезы «мира РНК» (первым ее сформулировал американский биохимик Г. Ноллер), согласно которой первичная рибосома на заре эволюции состояла только из РНК. Однако попытки обнаружить у изолированной рРНК функции, присущие рибосоме (в частности, способность катализировать образование пептидной связи), не привели к положительным результатам. Таким образом, на сегодняшний день очевидно, что, несмотря на основополагающую роль рРНК, уникальные функции рибосомы обеспечиваются скоординированными в высокой степени взаимодействиями между рРНК и белками.

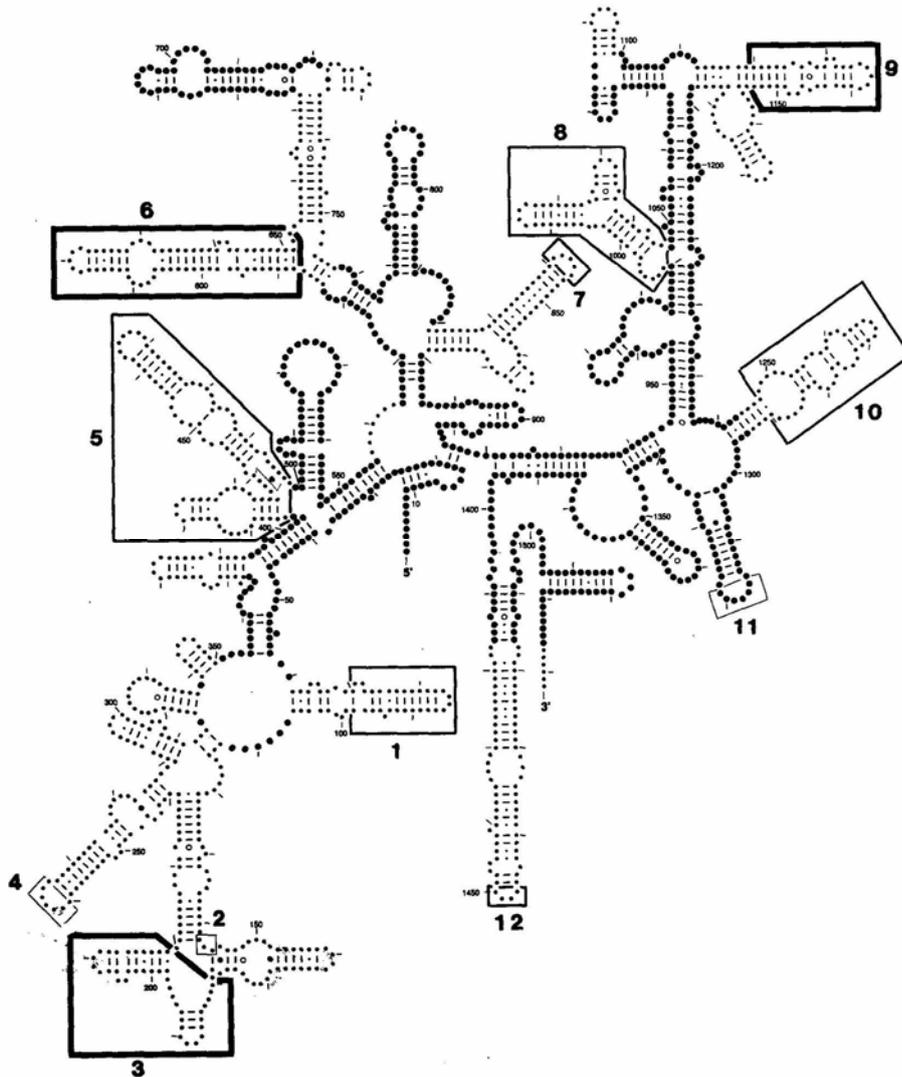


Рис. 2.12. Консервативные положения и сегменты экспансии во вторичной структуре рРНК малых рибосомных субчастиц, изображенные на структуре 16S рРНК *E. coli*. Большие кружки – положения, всегда присутствующие в универсальном «коре» вторичной структуры (сама последовательность в этих районах может быть вариабельной вследствие компенсаторных замен нуклеотидов). Маленькие кружки – положения, не входящие в универсальный «кор» вторичной структуры. Сегменты экспансии нумерованы и обведены прямоугольниками. Жирными линиями отмечены районы, где сегменты экспансии могут превышать 200 нуклеотидов в длину, линиями средней толщины отмечены районы, удлинненные по сравнению с рРНК *E. coli* на 50–200 нуклеотидов, а тонкими – на 10–50 нуклеотидов [10])

## 2.2. Рибосомные белки

Эукариотическая рибосома содержит около 80 белков – примерно в полтора раза больше, чем рибосома эубактерий, при этом до 33 белков в 40S субчастице и до 46 белков в 60S субчастице. В бактериальных 30S и 50S субчастицах содержится соответственно 21 и 34 белка. Длины полипептидных цепей рибосомных белков эукариот варьируют примерно в тех же пределах, что и у

бактериальных рибосомных белков – от 60 до 400 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярным массам от 7 до 50 кДа.

### 2.2.1. Номенклатура и особенности рибосомных белков

подавляющее большинство (более 9/10) рибосомных белков эукариот являются основными (содержат много остатков лизина и аргинина) и имеют значение  $pI$  в среднем около 10. Номенклатура основных рибосомных белков основана на положениях пятен белков на двумерных электрофореграммах в системе, где разделение в первом направлении происходит в слабощелочной среде, а во втором – в кислой. Номера белков увеличиваются на электрофореграмме слева направо и сверху вниз так, что наиболее тяжелые и наименее основные белки имеют наименьшие номера (эти белки занимают левый верхний угол электрофореграммы), а наиболее легкие и основные – наибольшие номера (правый нижний угол) (в качестве примера см. рис. 2.13). Так же, как в случае рибосомных белков прокариот, индекс S (от англ. small) означает принадлежность к малой, а L (от англ. large) – к большой субчастице. Немногочисленные (преимущественно кислые) рибосомные белки эукариот имеют «неноменклатурные» обозначения (например, белки P0, P1 и P2 в большой субчастице) (табл. 2.2). Некоторые из рибосомных белков эукариот были охарактеризованы относительно недавно. Так, белок RACK1 был выявлен в составе 40S субчастицы только в 1999 г., а белок PS1D в 60S субчастице – в 2002 г.

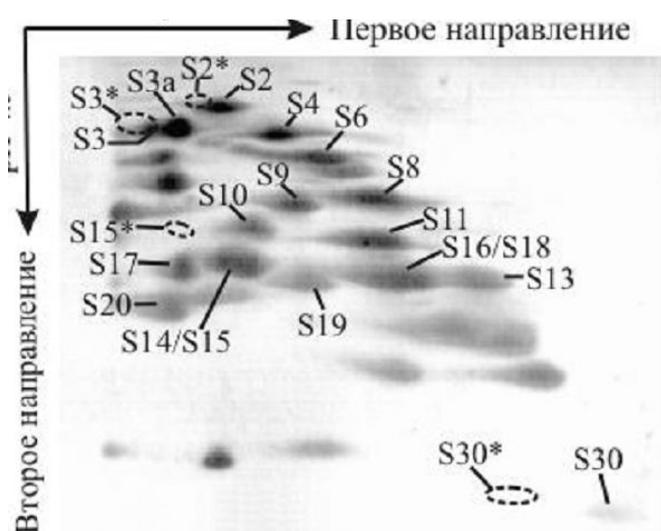


Рис. 2.13. Окрашенная двумерная электрофореграмма белков 40S субчастицы рибосом человека после разделения в полиакриламидном геле в первом направлении при pH 8.6, а во втором – при pH 4.5

Таблица 2.2

## Соответствие между рибосомными белками у трех царств жизни [11]

Малая субчастица				Большая субчастица			
Бактерии	Археи	Низшие эукариоты	Высшие эукариоты	Бактерии	Археи	Низшие эукариоты	Высшие эукариоты
S2	S2	S0	Sa (p40)	L1	L1	L1	L10a
S3	S3	S3	S3	L2	L2	L2	L8
S4	S4	S9	S9	L3	L3	L3	L3
S5	S5	S4	S2	L4	L4	L4	L4
S7	S7	S5	S5	L5	L5	L11	L11
S8	S8	S22	S15a	L6	L6	L9	L9
S9	S9	S9	S16	L10	L10	P0 (A0)	P0
S10	S10	S20	S20	L11	L11	L12	L12
S11	S11	S14	S14	L12	L12	P1/P2	P1/P2
S12	S12	S28	S23	L13	L13	L16	L13a
S13	S13	S18	S18	L14	L14	L23	L23
S14	S14	S29	S29	L15	L15	L28	L27a
S15	S15	S13	S13	L16	L10e	L10	L10
S17	S17	S18	S11	L18	L18	L5	L5
S19	S19	S15	S15	L22	L22	L17	L17
				L23	L23	L25	L23a
				L24	L24	L26	L26
				L29	L29	L35	L35
				L30	L30	L7	L7

Как правило, рибосомные белки присутствуют в рибосоме в виде одной копии, за исключением белков P1 и P2 эукариот, которые входят в состав рибосомы в виде комплекса  $P0*(P1)_2*(P2)_2$  (в рибосомах прокариот ему гомологичен комплекс белка L10 с белками L7/L12). В некоторых организмах (например, в грибе *Dictyostelium discoideum*) белковый состав рибосомы зависит от фазы развития, причем отсутствие определенных белков (в случае упомянутого гриба – белков P1 и P2) в составе рибосомы не приводит к потере ее активности, но способствует предпочтительной трансляции другого набора мРНК. Другим примером является белок p40 (Sa), который ассоциирован с рибосомами в активно растущих клетках и, наоборот, диссоциирует из них при снижении уровня трансляции. Такое поведение белка p40 связывают с его участием в процессе регуляции трансляции на стадии инициации, где он, по видимому, способствует связыванию с рибосомами фактора инициации eIF3. Кроме того, показано, что этот белок прямо вовлечен в связывание с малой субчастицей IRES-элемента РНК вируса гепатита С [12].

### **2.2.2. Гомология между рибосомными белками эукариот, эубактерий и архей**

Несмотря на огромную дистанцию в эволюции, разделяющую низшие и высшие эукариоты, рибосомы всех эукариот содержат практически одинаковый набор белков. Степень сходства между гомологичными белками эукариот довольно велика. Число идентичных аминокислотных остатков в гомологичных рибосомных белках дрожжей и млекопитающих составляет в среднем около 60 % и варьирует, в случае разных белков, в пределах от 40 до 88 %, а степень сходства между белками крысы и человека достигает 90–100 %.

Из 80 рибосомных белков эукариот 49 имеют гомологов среди белков архей и 32 – среди белков эубактерий; 31 белок является уникальным для эукариот. Интересно, что рибосомы архей, по сравнению с рибосомами эубактерий, имеют намного больше белков, гомологичных эукариотическим рибосомным белкам, при этом в бактериальных рибосомах нет белков, которые были бы гомологичны только белкам архей или только белкам эукариот. Вероятно, в процессе эволюции общий предок архей и эукариот отделился от бактерий прежде, чем архей отделились от эукариот. Количество идентичных аминокислотных остатков у гомологичных рибосомных белков бактерий (*E. coli*) и млекопитающих (крыса) составляет от 17 до 42 %, в среднем – 27 %.

Интересно, что не все рибосомные белки необходимы для поддержания жизнеспособности клетки. Так, эксперименты по «выключению» генов определенных рибосомных белков дрожжей позволили установить, что 28 белков необходимы для поддержания жизнеспособности клетки, а 10 являются «необязательными», хотя отсутствие последних в той или иной степени нарушает рост клеток. Очевидно, без «необходимых» белков сборка и/или функционирование рибосом невозможны, тогда как отсутствие «необязательных» белков лишь в той или иной степени нарушает процессы сборки и/или работу рибосомы. Следует отметить, что в числе «необязательных» белков оказались как белки, характерные только для эукариот и архей, так и белки, имеющие гомологов во всех трех царствах.

### **2.2.3. Внерибосомные функции рибосомных белков**

Уже в 70-х годах XX века появились данные, свидетельствующие о том, что некоторые рибосомные белки могут быть не только структурными компонентами рибосомы, но и выполнять другие функции в клетке, в том числе и функции, не имеющие отношения к трансляции. К настоящему времени большее число таких белков выявлено у эукариот. В начале XXI века было обнаружено, что у млекопитающих свободные рибосомные белки могут играть роль своеобразных «меток» самооценки здоровья клеток. Накапливаясь в клетке при нарушении процессов сборки рибосом, эти белки взаимодействуют с системами p53 или MDM2, способствуя остановке клеточного цикла или апоптозу (программированной гибели клетки). Подобные функции установлены пока для 6 белков большой и одного белка малой субчастицы рибосом эукариот.

Что касается других вне ribосомных функций ribосомных белков, можно привести следующие примеры [13]:

1) белок S3 дрозофилы и млекопитающих способен участвовать в процессе репарации («починке» повреждений) ДНК *in vitro*, хотя данных о его участии в этом процессе *in vivo* пока нет;

2) белок L13a эукариот может подвергаться фосфорилированию в составе ribосомы специальной протеинкиназой, после чего покидать ribосому и включаться в состав сложного белкового комплекса ГАТ, который ингибирует трансляцию определенных мРНК, при этом связывается с их 3'-нетранслируемой областью;

3) белок RACK1 (рецептор активированной киназы 1) малой ribосомной субчастицы эукариот, который не имеет гомологов у прокариот, вовлечен в систему сигнальной трансдукции клетки.

Некоторые белки, будучи модифицированными или олигомеризованными, выполняют вне ribосомные функции. Зачастую такие измененные формы белков имеют свои собственные названия. Так, белок p40 (Sa) малой субчастицы ribосом млекопитающих в форме димера способен специфически связываться с ламинином, а соответствующий димер называется ламинин-связывающим белком (ламинин – адгезивный гликопротеин межклеточного матрикса). Некоторые вирусы (например, вирус клещевого энцефалита и вирус венесуэльского энцефалита лошадей) используют ламинин-связывающий белок в качестве клеточного рецептора [14]. Пока вне ribосомные функции обнаружены у менее чем 1/4 ribосомных белков эукариот, однако вполне вероятно, что такие функции будут найдены и для других ribосомных белков.

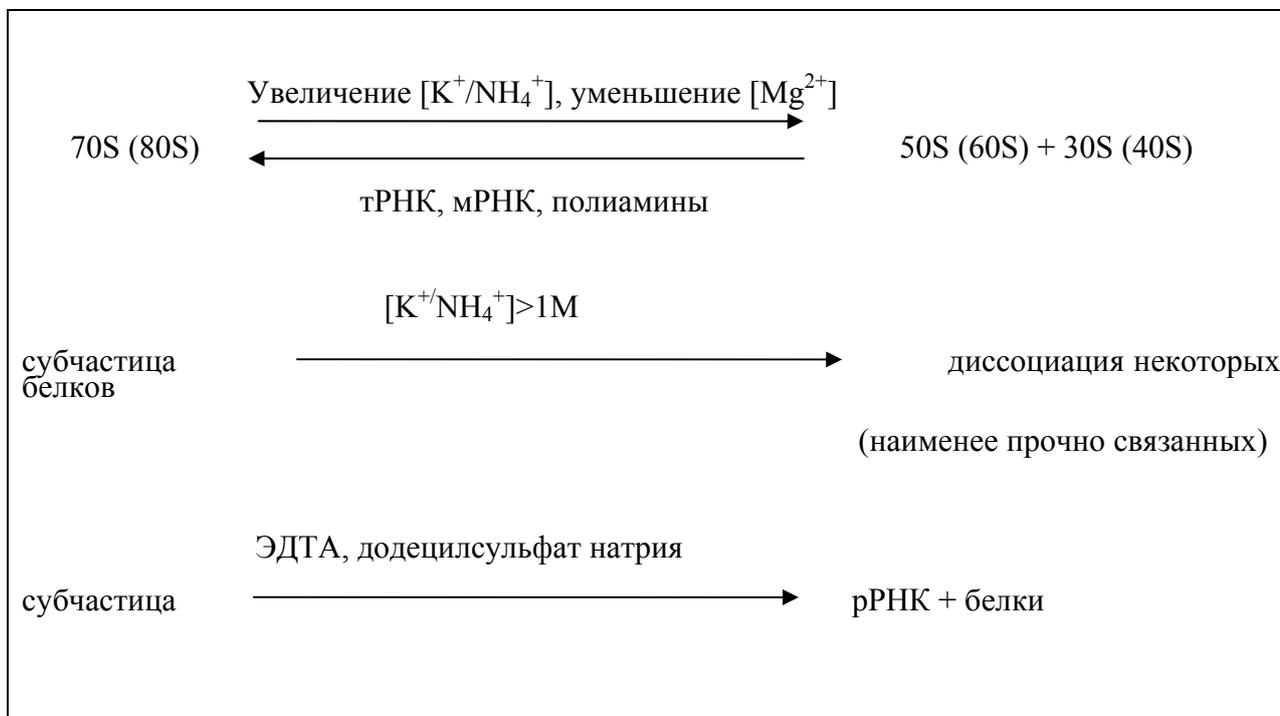
### 2.3. Ионы $Mg^{2+}$ и полиамины

Поскольку рРНК, являющаяся полианионом, играет основополагающую роль в структурно-функциональной организации ribосомы, активность и структура ribосомы очень сильно зависят от катионов металлов и полиаминов. В частности, физиологическая концентрация ионов  $K^+$  в клетках млекопитающих составляет 80–150 мМ, а  $Mg^{2+}$  – около 2 мМ; эти концентрации ионов  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  являются оптимальными для трансляции. Одновалентные катионы и ионы  $Mg^{2+}$  играют разную роль в поддержании структуры ribосомы. С увеличением концентрации  $Mg^{2+}$  резко возрастает взаимное сродство малой и большой субчастиц, а также сродство тРНК и мРНК к ribосоме в отсутствие факторов трансляции (в физиологических условиях в отсутствие факторов трансляции субчастицы не ассоциируют в 80S ribосому, а тРНК и мРНК не связываются с ribосомой). Повышение концентрации одновалентных катионов, напротив, ослабляет взаимное сродство 40S и 60S субчастиц; так, при 0,5 М  $K^+$  80S ribосомы полностью диссоциируют на субчастицы. Диссоциация ribосом на субчастицы обратима – при обратном изменении концентрации одновалентных катионов субчастицы могут вновь ассоциировать; наличие тРНК и мРНК на ribосоме повышает ее устойчивость к диссоциации. При концентрации одновалентных катионов ( $K^+$  или  $NH_4^+$ ) более 0,5 М начинается диссоциация

рибосомных белков из субчастиц эукариот (полная диссоциация субчастиц на белки и рРНК происходит при их обработке ЭДТА, связывающей ионы  $Mg^{2+}$ , в присутствии денатурирующего агента – например, додецилсульфата натрия); диссоциация белков из субчастиц прокариот происходит при более высоких концентрациях  $K^+$ . Легче диссоциируют белки, связанные в рибосоме преимущественно с другими белками, наиболее прочно удерживаются те, которые взаимодействуют с рРНК. При ступенчатом повышении концентрации  $K^+$  можно проводить последовательную диссоциацию определенных групп белков и получать набор промежуточных частиц с уменьшающимся количеством белков – от количества в полной субчастице до изолированной рРНК.

Зависимость эффективности трансляции мРНК *in vitro* от концентрации  $Mg^{2+}$  имеет классический колоколообразный характер, причем величина оптимальной для трансляции концентрации  $Mg^{2+}$  зависит от присутствия полиаминов. Наличие спермина или спермидина значительно (в 2–3 раза) снижает эту величину и одновременно в 2–3 раза увеличивает эффективность трансляции. Это указывает на то, что полиамины не только частично «замещают»  $Mg^{2+}$ , но и способствуют формированию наиболее оптимальной для функционирования структуры рибосом. Влияние полиаминов и  $Mg^{2+}$  на рибосомы прокариот в целом сходно с их влиянием на рибосомы эукариот.

Превращения рибосом и субчастиц *in vitro* можно схематически представить так:



Поскольку субчастицы имеют значительно различающиеся коэффициенты седиментации, их легко разделить высокоскоростным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (в качестве примера см. рис. 2.14).

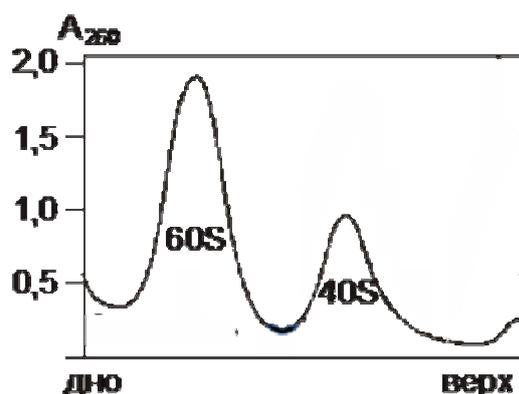


Рис. 2.14. Профиль седиментации рибосомных субчастиц человека после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (10%–30%) в условиях диссоциации 80S рибосом на субчастицы. После окончания центрифугирования содержимое центрифужных пробирок прокачивали через проточную кювету спектрофотометра, субчастицы регистрировали по поглощению УФ-света с длиной волны 260 нм

В клетке субчастицы ассоциированы в рибосому в процессе трансляции; незанятые в трансляции субчастицы находятся преимущественно в свободном состоянии.

### Глава 3. Сборка рибосомы

У прокариот рибосомы находятся в цитоплазме, там же происходит их сборка; в ней, кроме рибосомных белков и предшественника рРНК (пре-рРНК), содержащего последовательности всех рибосомных рРНК, участвуют около 20 вспомогательных белков. Схематически этот процесс представлен на рис. 2.15.

Эндонуклеазы разрезают пре-мРНК так, чтобы образовались соответствующие рРНК; хеликазы расплетают вторичную структуру РНК, способствуя ее связыванию с белками; РНК-метилтрансферазы и псевдоуридилазы модифицируют определенные основания рРНК, а шапероны способствуют укладке рРНК в составе субчастицы.

Примечательно, что рибосомные субчастицы бактерий можно реконструировать *in vitro* в специальных условиях – при высокой (по сравнению с физиологическими условиями) ионной силе – 350 мМ  $K^+$ , 20 мМ  $Mg^{2+}$  и температуре – 44–50°C, что заменяет действие вспомогательных факторов. Первым реконструкцию активных рибосомных субчастиц *E. coli* осуществил японский ученый М. Номура еще в 1970 г. Таким образом, информация о

структуре и сборке рибосом бактерий заложена уже в самих последовательностях рРНК и рибосомных белков.

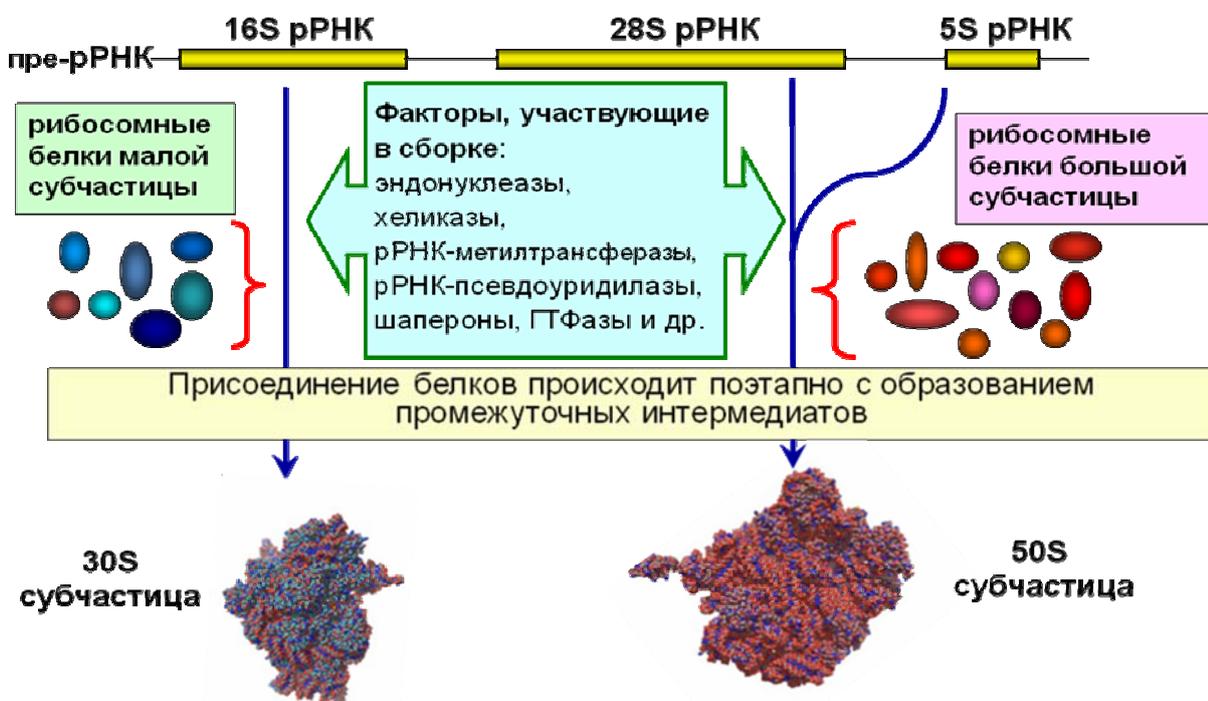


Рис. 2.15. Основные этапы сборки рибосомных субчастиц

У эукариот цитоплазматические рибосомы могут находиться в свободном состоянии (в случае синтеза белков для внутриклеточного потребления) или быть прикрепленными к мембране эндоплазматического ретикулума (при синтезе белков, которые должны транспортироваться из клетки). Кроме цитоплазматических рибосом, клетки эукариот содержат относительно небольшие количества рибосом в хлоропластах и митохондриях, однако эти рибосомы отличаются от цитоплазматических и больше напоминают рибосомы бактерий. Сборка цитоплазматических рибосом эукариот происходит намного более сложным образом, чем сборка рибосом прокариот. Начинается она в ядрышке, продолжается в ядре, и участвуют в ней более 200 вспомогательных факторов. В этом процессе до сих пор остается много непонятного; схематически процесс сборки представлен на рис. 2.16. Осуществить сборку рибосомных субчастиц эукариот *in vitro* пока никому не удалось.

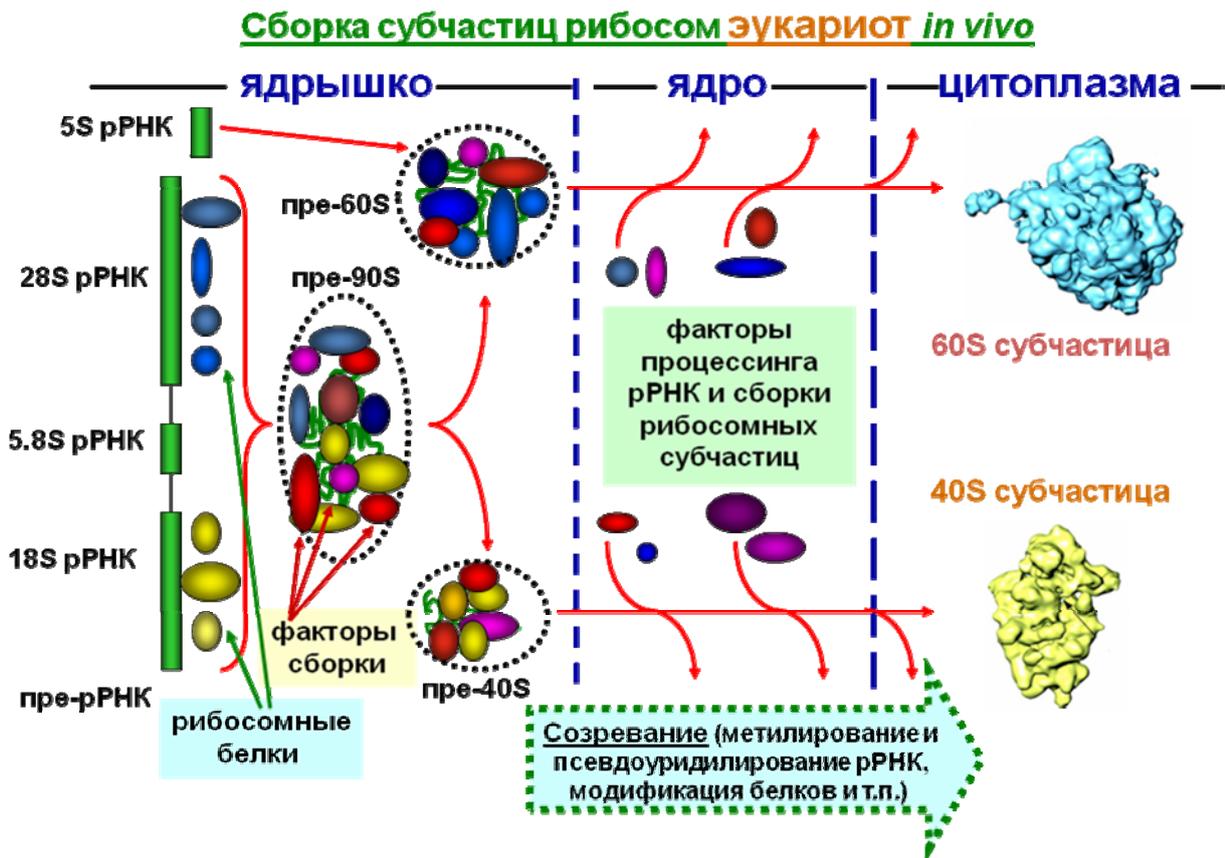


Рис. 2.16. Основные этапы сборки рибосомных субчастиц эукариот

## Глава 4. Методы изучения строения рибосомы и ее функциональных центров

История изучения строения рибосом насчитывает почти полвека со времени их открытия. Методы изучения рибосом и других нуклеопротеидов разнообразны и представляют особый интерес.

### 4.1. Рентгеноструктурный анализ (РСА)

РСА применим к закристаллизованным рибосомным субчастицам, рибосомам и их модельным комплексам с участниками процесса трансляции (тРНК, мРНК и пр.). Принцип метода состоит в том, что кристалл облучают рентгеновскими лучами, длина волны которых сопоставима с длиной химической связи. В результате получают очень сложную дифракционную картину, которая после проявления выглядит в виде десятков и сотен тысяч точек, строго определенным образом расположенных друг относительно друга («звездного неба»). Если кристаллы хорошего качества, то такую картину можно расшифровать с помощью специальных компьютерных программ, и это позволяет определить координаты всех атомов, из которых они построены. Поэтому РСА считают одним из наиболее мощных и информативных методов

для изучения строения рибосом и других сложных белково-нуклеиновых комплексов.

К недостаткам метода можно отнести в первую очередь трудности кристаллизации, а кристаллизация каждого нового модельного комплекса рибосом прокариот с участниками процесса трансляции является событием. Получить пригодные для РСА кристаллы рибосом даже простейших эукариот удалось впервые лишь в 2010 г. (это было сделано в группе М. Юсупова во Франции и Н. Бана в Швейцарии). Определенные с помощью РСА координаты атомов рибосом и их модельных комплексов помещают в доступный через Интернет банк данных, каждая структура имеет свой код, который известен из публикаций в научных журналах. Визуально структурная информация представляется любым удобным образом. В качестве примера приведем структуру малой субчастицы рибосом термофильной бактерии *Thermus thermophilus*, полученную в 2002 г. в лаборатории В. Рамакришнана – одного из трех Нобелевских лауреатов по химии 2009 г., получивших премию за расшифровку структуры рибосомы (рис. 2.17).

При всей ценности результатов, полученных с помощью РСА, следует учитывать, что кристаллы рибосом образуются в условиях, очень далеких от физиологических: при высокой концентрации солей и в присутствии специальных органических добавок (например, метилпентандиола) при пониженной температуре. Поэтому строение реально работающей рибосомы может заметно отличаться от строения рибосомы в кристалле. Наконец, РСА дает информацию только об одном, «замороженном», состоянии рибосомы и не дает представления о конформационной динамике рибосомы в процессе трансляции. Поэтому полноценное представление о структуре транслирующей рибосомы можно получить только из совокупности данных, полученных с помощью РСА и различных биохимических подходов, о которых речь в следующем разделе.

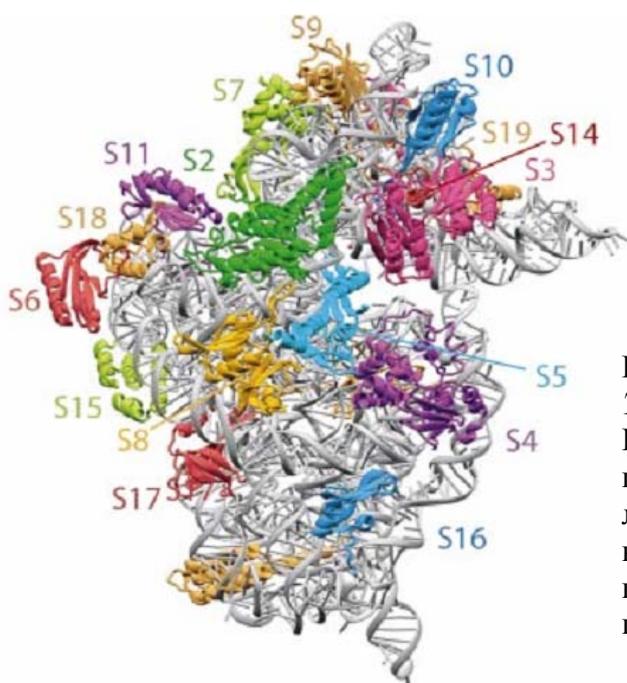


Рис. 2.17. Строение малой субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* по данным РСА. Полипептидные цепи белков и полинуклеотидные цепи рРНК изображены ленточками. Рибосомные белки (в которых видны участки  $\alpha$ -спиралей) выделены разными цветами и подписаны, рРНК отмечена серым цветом [15]

## 4.2. Электронная микроскопия

Размеры рибосомы в десятки раз меньше, чем длина волны видимого света, поэтому ее невозможно рассмотреть даже в самый совершенный оптический микроскоп, но можно «увидеть» с помощью электронного микроскопа, использующего пучок электронов вместо света. Уже в 70-х гг. XX века с помощью *электронной микроскопии (ЭМ)* удалось получить изображения рибосом и субчастиц, позволяющих судить об их очертании. Одни из первых изображений рибосом были получены в пущинском Институте белка, возглавляемом в то время академиком А. С. Спириным. Одновременно в группах Г. Штоффлера, И. Шталя (Германия) и Дж. Лэйка (США) для определения положения рибосомных белков на поверхности рибосомных субчастиц стали применять *иммуно-ЭМ*. Для этого рибосомные субчастицы обрабатывали антителами против определенного рибосомного белка и смотрели, к какому участку субчастицы антитела присоединялись (такие участки называются антигенными детерминантами). Однако точность определения была невысокой, кроме того, у одних белков существовало несколько антигенных детерминант, удаленных друг от друга на поверхности субчастицы, а у других не было вовсе.

Резкий скачок в информативности метода ЭМ произошел в середине 1990-х гг., когда в лаборатории Й. Франка (США) был разработан новый подход – *крио-ЭМ*, основанный на получении электронной микрофотографии рибосом (т. е. карты распределения электронной плотности в рибосоме) при температуре жидкого азота. Для получения крио-ЭМ изображения используют монослой рибосом, нанесенный на специальную тонкую углеродную решетку. В 2000 г. были созданы программы, позволяющие разделять электронную плотность в крио-ЭМ на белковую и рРНК-овую составляющие и подгонять крио-ЭМ карты рибосом к атомным моделям рибосомных субчастиц прокариот. Это позволило распознавать фрагменты консервативного кода РНК и рибосомные белки, имеющие прокариотических гомологов. За 10–12 лет, прошедших с момента изобретения метода, с помощью крио-ЭМ научились получать изображения рибосом с разрешением 7–8 ангстрем (это позволяет видеть, например, отдельные витки  $\alpha$ -спиралей белков), что всего в 2–3 раза меньше разрешения, которое обычно дает РСА. Резкое увеличение разрешающей способности крио-ЭМ по сравнению с «обычной» электронной микроскопией связано, в частности, с тем, что при очень низкой температуре «замораживаются» тепловые движения структурных элементов рибосомы, которые сильно размывают изображение, полученное с помощью «обычной» ЭМ. Примеры крио-электронных изображений рибосом приведены на рис. 9 и 10.

Достоинством крио-ЭМ по сравнению с РСА является то, что этот метод не требует выращивания кристаллов – процедуры длительной и не всегда дающей результат. Кроме того, для крио-ЭМ необходимо намного меньше материала, чем для РСА. Однако разрешение, которое достигнуто к настоящему времени, не позволяет четко «видеть» ряд важных элементов, например, неструктурированные нитевидные фрагменты рибосомных белков и рРНК,

кодона мРНК и др. Кримо-ЭМ пока не удалось применить для изучения лабильных комплексов рибосом с некоторыми участниками процесса трансляции (например, с фактором eRF1 эукариот).

### 4.3. Футпринтинг

Футпринтинг объединяет группу методов, предназначенных для определения участков рРНК, вовлеченных в связывание с рибосомой участников процесса трансляции (чаще всего тРНК или факторов трансляции), называемых для краткости лигандами рибосомы. Суть метода состоит в определении нуклеотидов рРНК, меняющих доступность действию химических реагентов или ферментов при связывании лиганда (название метода связано с тем, что лиганд, защищая определенные участки рРНК, оставляет свой «отпечаток» на рибосоме). Краткая характеристика модифицирующих реагентов и ферментов, наиболее часто используемых для футпринтинга, дана в табл. 2.3. Гидроксил-радикальный футпринтинг РНК в составе нуклеопротеидов стал развиваться относительно недавно; гидроксил-радикалы, способные расщеплять фосфодиэфирные связи РНК, обычно генерируют, используя перекись водорода и катализаторы ее диссоциации, например, ионы  $Fe^{2+}$  в сочетании с аскорбиновой кислотой. Положение модифицированных реагентами нуклеотидов или разрывов в рРНК определяют с помощью обратной транскрипции – синтеза комплементарной цепочки ДНК по РНК как по матрице с использованием меченого праймера – короткого фрагмента ДНК, комплементарного 3'-концевой части изучаемой области РНК. Синтез растущей цепи обрывается, когда обратная транскриптаза доходит до модифицированного основания в РНК, которое не может образовывать «нормальную» комплементарную пару, или до места разрыва в РНК. Синтезированные фрагменты комплементарной ДНК определяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле точно так же, как это делают при секвенировании по методу Сэнджера (с использованием дидезоксинуклеозид-трифосфатов, или «стопперов», в параллельных экспериментах).

При интерпретации результатов футпринтинга следует иметь в виду, что защита любого нуклеотида рРНК от химической модификации или гидролиза может быть связана не только с тем, что он экранирован лигандом, но и со структурными перестройками в рРНК, вызванными связыванием лиганда в отдаленном от этого нуклеотида участке рибосомы. Наиболее информативные результаты дает применение и химического, и ферментативного футпринтинга одновременно, поскольку участки, где меняется доступность нуклеотидов для химической модификации, могут не совпадать с участками, где меняется доступность фосфодиэфирных связей для гидролиза ферментами.

Первые значительные результаты по изучению структуры и функции рибосом с помощью химического футпринтинга были получены в группе американского рибосомолога Г. Ноллера в 80-х гг. XX века (см., например, [16]). При сравнении наборов нуклеотидов рРНК в рибосомах *E. coli*, защищаемых от модификации молекулами тРНК в составе различных модельных комплексов,

удалось определить, какие участки рРНК вовлечены в формирование А-, Р- и Е-участков и пептидилтрансферазного центра, и выдвинуть ряд принципиальных предположений о том, что тРНК при движении в процессе цикла элонгации из А-участка в Р, а из Р-участка в Е проходит через промежуточные так называемые «гибридные» состояния. В частности, перед транслокацией пептидил-тРНК из А-участка в Р после связывания фактора EF-G и GTP молекула пептидил-тРНК переходит в гибридное состояние А/Р (3'-конец с растущим пептидом уже в Р-участке, а антикодон все еще связан с кодоном мРНК в А-участке), а молекула деацелированной тРНК в Р-участке – в гибридное состояние Р/Е (3'-конец уже в Е-участке, а антикодон все еще связан с кодоном мРНК в Р-участке). В настоящее время существование гибридных состояний тРНК подтверждено различными методами, в том числе и для рибосом эукариот. В «пост-рентгеновскую эпоху» (в XXI веке) футпринтинг используют в основном для изучения рибосом эукариот, к которым пока неприменим метод РСА, в основном – для определения участков рРНК, вовлеченных во взаимодействие с факторами трансляции или рибосомными белками.

Таблица 2.3

**Модифицирующие реагенты и РНКазы, наиболее часто применяющиеся для футпринтинга рРНК в рибосомах (X обозначает любой нуклеотид)**

Реагент или РНКазы	Специфичность		Сайт модификации или разрыва
	Районы структуры РНК	Природа нуклеотида	
Диметилсульфат	одноцепочечные	А, С и G	N1 в А, N3 в С, N7 в G
1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимид мето-р-толуолсульфонат	одноцепочечные	G и U	N3 в U, N1 в G
Кетоксаль	одноцепочечные	G	N1 и N1 в G
Диэтил пирокарбонат	одноцепочечные		
РНКазы T1	одноцепочечные	G	Gp
РНКазы V1	Нуклеотиды в двуцепочечных участках или в состоянии стэкинга	X	Xp↓
РНКазы CL3	одноцепочечные	C	Cp↓
MНаза	одноцепочечные	X	p X↓
Pb (II)	одноцепочечные или лабильные двуцепочечные	X	Xp↓
Радикалы OH <sup>-</sup> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Fe <sup>2+</sup> + аскорбиновая кислота)	одноцепочечные или лабильные двуцепочечные	X	Xp X↓

Наконец, для определения положения мРНК на рибосоме используют метод *тоу-принтинга*. В основе метода – обратная транскрипция на мРНК (в составе комплекса с рибосомой) как на матрице с использованием праймера, комплементарного 3'-концевому фрагменту мРНК, находящемуся вне рибосомы (рис. 2.18). Обратная транскриптаза ведет синтез кДНК до тех пор, пока «не натолкнется» на рибосому. Определив длину синтезированной кДНК, можно судить о том, какая часть мРНК с 3'-стороны находится вне рибосомы, и тем самым установить положение мРНК на рибосоме. Метод очень удобен для того, чтобы следить за процессом транслокации мРНК, поскольку передвижение мРНК на один триплет в 5'-сторону приводит к укорочению на три нуклеотида 3'-концевой части мРНК, находящейся вне рибосомы.

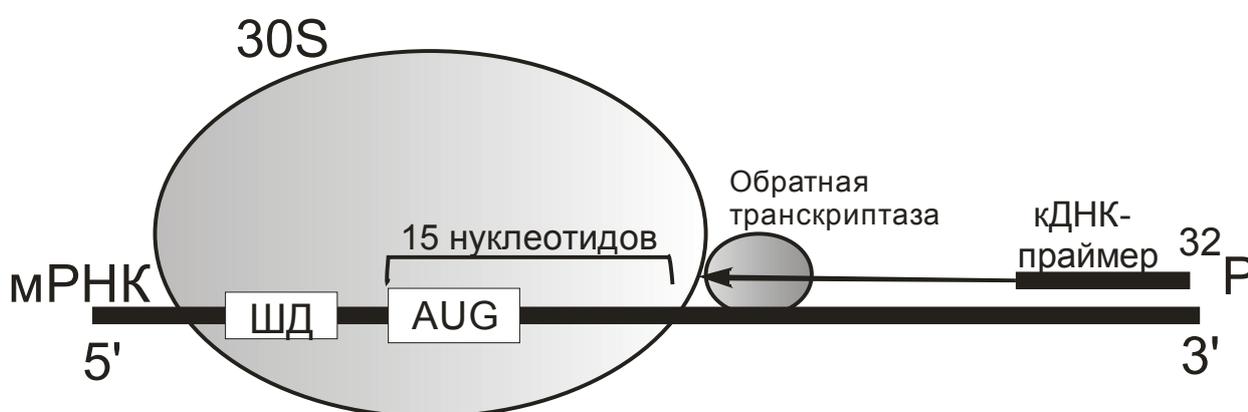


Рис. 2.18. Принципиальная схема определения положения мРНК на рибосоме с помощью тоу-принтинга

#### 4.4. Аффинная модификация

Аффинная модификация, или аффинное химическое сшивание, основано на использовании химически активных производных лигандов рибосомы – участников процесса трансляции (тРНК, мРНК и пр.), несущих сшивающие группы в определенных положениях [17]. Такие производные (которые принято называть аффинными реагентами) сшивают с рибосомами в составе комплексов, моделирующих ту или иную стадию трансляции, и затем определяют, к каким рибосомным белкам и/или нуклеотидам рРНК они ковалентно присоединились. В результате получают информацию о том, с какими структурными элементами рибосомы соседствует фрагмент лиганда, несущий сшивающую группу. Аффинный реагент обычно несет также метку (чаще всего радиоактивную), позволяющую следить за компонентами рибосомы, к которым он присоединился. Как правило, для изучения функциональных центров рибосом использовали аффинные реагенты на основе тРНК или фрагментов мРНК, поскольку получение аффинных реагентов на основе факторов трансляции – намного более

сложная задача. На рис. 2.19 в качестве примера приведена схема эксперимента по аффинной модификации рибосом реакционноспособным аналогом мРНК.

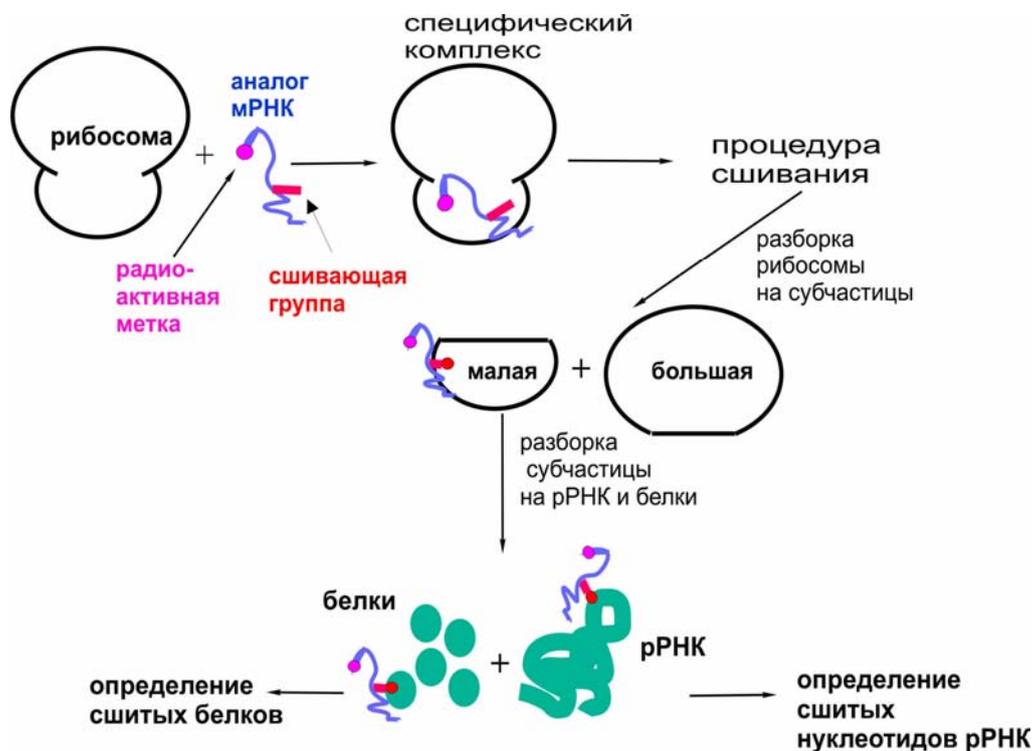


Рис. 2.19. Схема эксперимента по аффинной модификации рибосом реакционноспособными аналогами мРНК

В становлении и развитии метода аффинной модификации для изучения не только рибосом, но и активных центров ферментов и различных комплексов нуклеиновых кислот огромную роль сыграл Новосибирский институт биоорганической химии АН СССР (с 2003 г. – Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН), основанный академиком Д. Г. Кнорре.

Для получения специфического комплекса используют тРНК (на схеме опущена), узнающую кодон аналога мРНК, направляемый в Р-участок рибосомы, благодаря чему нуклеотид со сшивающей группой можно поместить в любое положение относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке. При повышенной концентрации  $Mg^{2+}$  стабильные комплексы рибосом с мРНК и тРНК образуются и без участия факторов трансляции, причем тРНК в этих условиях имеет наибольшее сродство к Р-участку рибосомы. Сшитые белки, несущие меченый аналог мРНК, определяют с помощью двумерного гелеэлектрофореза в сочетании с другими методами – иммунопреципитацией или иммуноблотингом, которые позволяют «опознать» белок с помощью специфических антител против этого белка, или масс-спектрометрии. Сшитые нуклеотиды рРНК определяют с помощью обратной транскрипции (см. предыдущий раздел).

*Реакционноспособные группы*, которые вводят в лиганды рибосомы, можно подразделить на два класса – *химически активные* и *фотоактивируемые*. В качестве химически активных чаще всего используют алкилирующие (содержащие, например, ароматическую 2-хлорэтиламиногруппу –  $\text{RNXCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ) или ацилирующие (с группировками типа бромацетил- или иодацетил). Оба типа реагентов являются электрофилами и реагируют с нуклеофильными центрами нуклеиновых кислот и белков. В случае ароматических 2-хлорэтиламинов реакция протекает через лимитирующую стадию образования промежуточной активной частицы – этилениммониевого катиона [18]. Атаке алкилирующими реагентами подвергаются атомы серы и азота в аминокислотных остатках и атомы N7 гуанина, N1 аденина и N3 цитозина в РНК, а ацилирующие реагенты – преимущественно атомы серы и азота в белках. В качестве фотоактивируемых чаще всего используют ароматические азиды, в которых азидогруппа  $\text{N}_3$  присоединена к бензольному кольцу, содержащему в качестве заместителей нитрогруппы и/или атомы фтора. При облучении мягким ультрафиолетовым светом (в условиях, когда не возбуждаются основания нуклеиновых кислот) азидогруппа диссоциирует на молекулу азота и бирадикал нитрен  $\text{N}:$ , способный реагировать с самыми разнообразными функциональными группами белков и нуклеиновых кислот. Кроме того, способностью образовывать сшивки с белками и РНК при облучении мягким УФ-светом обладают нуклеотиды, у которых атом кислорода в гетероцикле замещен на серу; чаще всего используют 4-тиоуридин ( $\text{s}^4\text{U}$ ).

Фотоактивируемые реагенты получили большее распространение, поскольку они обладают очевидным преимуществом по сравнению с химически активными реагентами: фотосшивку можно «включить» в необходимый момент, когда нужный модельный комплекс уже образовался, тогда как химически активный реагент начинает реагировать сразу же после того, как оказался в растворе, и может присоединяться к рибосоме не только в составе «готового» комплекса, но и в процессе связывания лиганда с рибосомой.

Достоинством метода аффинной модификации является то, что он дает информацию, какие структурные элементы рибосомы фактически соседствуют с лигандом в условиях, близких к физиологическим (в отличие от «замороженных» состояний при РСА и крио-ЭМ). Однако каждый тип сшивающей группы имеет свои предпочтения среди мишеней в белках и РНК, и нельзя исключить, что отдельно взятый реагент может «не заметить» важный компонент функционального центра, если в этом компоненте нет подходящей мишени для сшивки. Поэтому наиболее объективную информацию о «соседях» лиганда на рибосоме можно получить, сопоставляя данные, полученные с помощью реагентов с различной природой сшивающих групп.

Альтернативным подходом является сшивание немодифицированного лиганда с рибосомой с помощью бифункциональных сшивающих реагентов (содержащих две химически активных группы, одна из которых ковалентно присоединяется к лиганду, а другая – к рибосоме) или с помощью облучения УФ-светом с длиной волны около 260 нм, который возбуждает все

гетероциклические основания РНК и ароматические кольца аминокислотных остатков. Этот подход использовали чаще в более ранних работах, поскольку по информативности он уступает аффинной модификации – в шшивке посредством реагентов или УФ-света участвует практически весь лиганд, и разобраться, какой участок лиганда сшивается с какими структурными элементами рибосомы, сложно, а во многих случаях просто невозможно.

#### 4.4.1. Аналоги тРНК

Есть два подхода к получению реакционноспособных аналогов тРНК. Первый – направленно вводить сшивающие группы в определенные точки природной тРНК, которые имеют характерные только для них химические свойства. Подобной точкой может быть минорный нуклеотид, присутствующий в тРНК в единственном экземпляре, например, остаток  $s^4U$  с реакционноспособным атомом серы, 3'-концевая рибоза с цис-диолевой группировкой или 5'-концевой фосфат, а также альфа-аминогруппа аминокислотного остатка аа-тРНК. Работа, в которой впервые показана возможность применения химически активных аналогов тРНК для изучения строения тРНК-связывающего центра рибосомы, была выполнена в 1971 г. Е. С. Бочкаревой, В. Г. Будкером и А. С. Гиршовичем в лаборатории Д. Г. Кнорре в Новосибирске. В этой работе использовался аналог фенилаланил-тРНК, несущий алкилирующую группу – остаток 4-[бис(2-хлорэтил)амино]бензолбутановой кислоты (хлорамбуцилил-), присоединенный по альфа-аминогруппе остатка Phe. Позже в других лабораториях, используя аналоги тРНК с разнообразными сшивающими группами на аминокислотных остатках аа-тРНК и пептидил-тРНК, были определены рибосомные белки и нуклеотиды рРНК большой субчастицы, участвующие в формировании пептидилтрансферазного центра рибосомы (такие работы сделаны в основном на рибосомах прокариот). Производные тРНК с арилазидогруппами, статистически распределенными по остатками гуанозина, использовали в 1980-е гг. в группе Г. Г. Карповой (Новосибирск) для определения рибосомных белков, окружающих тРНК в А-, Р- и Е-участках рибосомы *E.coli*. Такие производные легко могут быть получены с помощью алкилирования тРНК 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина, модифицирующего преимущественно остатки гуанозина, с последующим селективным присоединением по алифатическим бензиламиногруппам арилазидогруппы (в упомянутых работах введение арилазидогруппы осуществляли путем обработки алкилированной тРНК 2,4,-динитро-5-фторфенилазидом).

С помощью трех типов производных тРНК, несущих арилазидогруппу на уникальных минорных основаниях тРНК –  $s^4U$  вблизи акцепторного стебля, 5-карбоксиметоксиуридине вблизи антикодона или так называемом «основании X» в варибельной петле в группе

Дж. Оффенганда (США) в 1980-х гг. удалось определить компоненты прокариотической рибосомы, соседствующие с соответствующими районами молекул тРНК, связанных в А- или Р-участке рибосомы.

Другая стратегия для получения химически активных производных тРНК – их сборка из фрагментов тРНК (синтезированных искусственно или полученных из природных тРНК с помощью рибонуклеаз). К одному фрагменту присоединяют фотоактивируемый нуклеотид (например, 4-тиоуридин, 2-азидoadенозин или 8-азидoadенозин) с помощью РНК-лигазы, а затем к полученному продукту присоединяют другой фрагмент тРНК так, что получается целая молекула тРНК с фотоактивируемым нуклеотидом в заданном положении. Эта стратегия позволяет вводить сшивающую группу практически в любое положение тРНК. С помощью подобных производных в группе Р. Зиммермана (США) в 1990-х гг. было изучено расположение антикодона и акцепторной шпильки тРНК на прокариотической рибосоме.

#### 4.4.2. Аналоги мРНК

В 1973 г. была опубликована работа В. Г. Будкера, А. С. Гиршовича и их соавторов из лаборатории Д. Г. Кнорре (Новосибирск), в которой демонстрировалось, что производные коротких олигорибонуклеотидов с алкилирующей группой на 3'-конце (рис. 2.20, б) могут быть использованы в качестве аналогов мРНК для аффинной модификации рибосом. В дальнейшем аналоги мРНК с алкилирующей группой на 3'- или 5'-конце (рис. 2.20, а, б) активно использовались в 1980-е гг. в группе Г. Г. Карповой для изучения мРНК-связывающего центра рибосом *E. coli*.

Широкое распространение для изучения мРНК-связывающего центра рибосом получили синтетические аналоги мРНК, несущие фотоактивируемый остаток  $s^4U$  в определенном положении. Такие аналоги получают транскрипцией *in vitro* с помощью РНК-полимеразы, используя в качестве матрицы специально сконструированные синтетические ДНК, задающие последовательность мРНК с единственным остатком уридина в определенном положении. При транскрипции в смесь рибонуклеозидтрифосфатов добавляют  $s^4UTP$  вместо UTP, в результате чего в цепь синтезируемого аналога РНК встраивается остаток  $s^4U$ . С помощью подобных аналогов мРНК в 1990-х гг. XX века в лабораториях Р. Бримакомба (Германия) и П. Воллензиена (США) был детально изучен мРНК-связывающий центр прокариотической рибосомы. Полученные данные о структурных элементах рибосомы, формирующих мРНК-связывающий канал, впоследствии подтвердились при расшифровке структуры рибосомы с помощью РСА. В 2006–2009 гг. подобные аналоги использовались в лаборатории Т. Пестовой (США) для изучения мРНК-связывающего центра рибосом млекопитающих [19], для которых такую информацию пока можно получить только с помощью аффинной модификации (крио-ЭМ не позволяет «видеть» неструктурированную одноцепочечную мРНК).

Аналоги мРНК – производные коротких олигорибонуклеотидов (длиной 6–12 звеньев), несущие различные модифицирующие группы на определенном нуклеотидном остатке (рис. 2.20), – были широко использованы в лаборатории Г. Г. Карповой (Новосибирск) для изучения структурно-функциональной топографии рибосом человека. Одним из преимуществ таких аналогов является

то, что сшивающую группу можно поместить практически в любое положение мРНК, а не только в то, которое предназначено для остатка уридина (как в случае аналогов с  $s^4U$ ), и не только по остатку гетероциклического основания.

Результаты работ по аффинной модификации рибосом человека, впервые полученные в лаборатории Г. Г. Карповой (см., например, [20]), в дальнейшем были практически полностью подтверждены данными, полученными в группе Т. Пестовой на рибосомах кролика с использованием аналогов мРНК, содержащих остатки  $s^4U$  [19].

Результаты работ по изучению мРНК-связывающего центра рибосом млекопитающих показали, что все нуклеотиды 18S рРНК, сшивающиеся с аналогами мРНК, находятся в эволюционно консервативных районах рРНК малых рибосомных субчастиц и по положению во вторичной структуре точно соответствуют нуклеотидам 16S рРНК, контактирующим с мРНК по данным РСА рибосом прокариот. Следовательно, нуклеотиды рРНК малых субчастиц, окружающие мРНК, составляют консервативный «кор» (сердцевину) рибосомы, практически одинаковый в рибосомах всех организмов [20]. Однако в белковом окружении мРНК на рибосомах прокариот и эукариот обнаружили большие различия. Так, с мРНК с 5'-стороны от кодона в Р-участке соседствует в основном белок S26, не имеющий гомологов среди рибосомных белков прокариот [20], а в

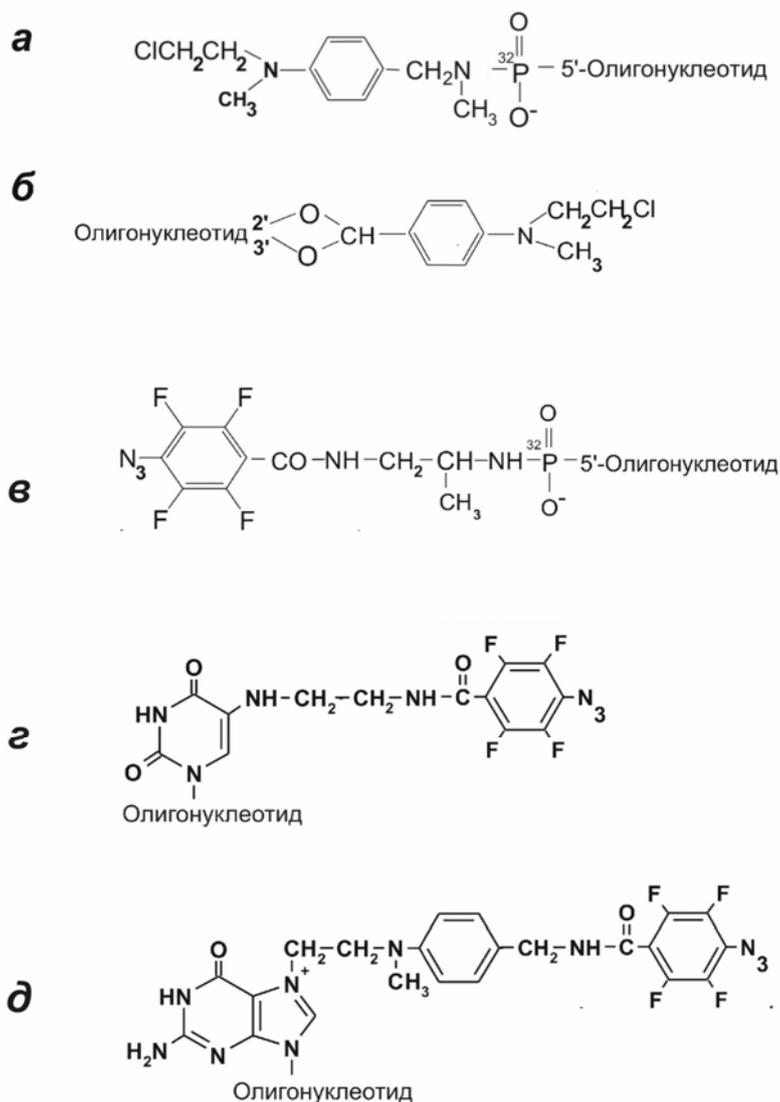
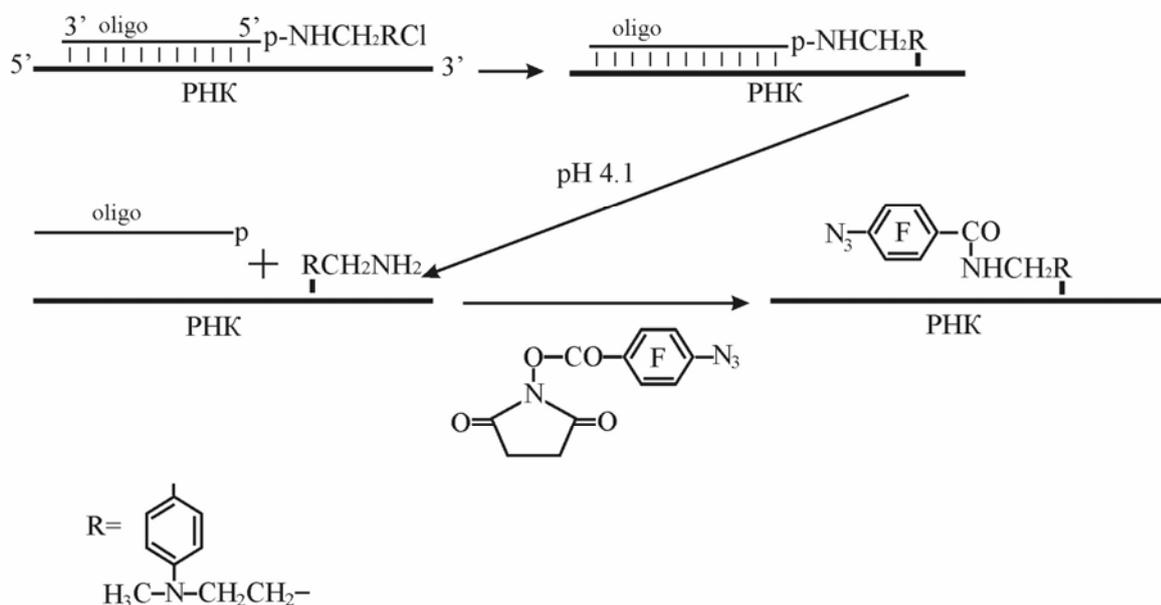


Рис. 2.20. Типы производных олигорибонуклеотидов с алкилирующей группой на 5'-фосфате (а) или на 3'-концевой рибозе (б) и с фотоактивируемой группой на 5'-фосфате (в), атоме С5 остатка урацила (з), или атоме N7 остатка гуанина (д), использованных в качестве аналогов мРНК

декодирующем центре рибосом человека обнаружен уникальный для эукариот и архей С-концевой фрагмент белка S15 [21], прокариотический гомолог которого (S19p) на 30S субчастице удален от мРНК-связывающего центра. Эти данные поставили под сомнение широко распространенную точку зрения, что эукариотическая рибосома представляет собой усложненную копию прокариотической рибосомы, в которой все функциональные центры устроены так же, как и в прокариотической рибосоме. Возможно, что те рибосомные белки мРНК-связывающего центра рибосом эукариот, которые не имеют прокариотических гомологов, способны взаимодействовать с различными (пока неизвестными) факторами, влияющими на эффективность и точность трансляции, или служить мишенями для этих факторов. Это, в свою очередь, может обеспечивать более сложную и многостадийную систему регуляции белкового синтеза у эукариот по сравнению с прокариотами.

Отдельно следует сказать о способе введения сшивающей группы в РНК, которые имеют сложную вторичную структуру. Этот способ разработан Д. М. Грайфером и Г. Г. Карповой в 1985 г. и основан на методе комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот, предложенном еще в 70-е гг. XX века Н. И. Гриневой в лаборатории Д. Г. Кнорре в Новосибирске. Фотоактивируемую группу вводят в заданное положение РНК по следующей схеме (oligo – дезоксирибо-олигомер, комплементарный району РНК, вблизи которого вводят фотоактивируемую группу):



В первой работе, опубликованной в 1985 г., фотоактивируемая группа была введена в определенное положение тРНК, а в 2006 г. с помощью данного подхода подобные группы удалось ввести в IRES-элемент РНК вируса гепатита С. С помощью набора производных этого IRES-элемента, несущих сшивающие группы в разных положениях, в лаборатории Г. Г. Карповой были определены рибосомные белки 40S субчастицы рибосомы человека, вовлеченные в организацию участка связывания IRES [5].

#### 4.5. Другие методы исследования рибосом

Методы, рассмотренные в пп. 4.1–4.4, сыграли наибольшую роль в установлении структуры рибосомы и строения ее функциональных центров и уже имеют свою историю, однако ими, конечно, не исчерпывается набор методов, использованных для изучения рибосом. Из методов, которые подробно не были рассмотрены, стоит упомянуть малоугловое рассеяние нейтронов или рентгеновских лучей, позволяющее получать информацию о компактности частицы и радиусе инерции (радиусе вращения), что позволяет судить, в частности, о том, в каком виде частица находится в растворе – в мономерном или олигомерном. Метод ЯМР на ядрах  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$  позволяет изучать в растворе динамические свойства рибосомных компонентов или лигандов, связанных с рибосомой. Для изучения прокариотической рибосомы и ее субчастиц используют также группу методов, в основе которых лежит их способность к самосборке *in vitro* из суммы белков и рРНК. В выбранных участках рибосомного белка или рРНК можно делать замены (или делеции) аминокислотных остатков или нуклеотидов, затем собирать рибосому с участием такой «мутантной» формы белка или рРНК и смотреть, сохраняется ли способность к сборке. Если не сохраняется, значит, данный участок задействован в сборке. Если сборка происходит, то можно выяснить, оказывает ли влияние на какую-либо функцию рибосомы (способность связывать аа-тРНК, факторы трансляции, синтезировать пептидную связь, проводить транслокацию и пр.) сделанная замена или делеция, и таким образом получить информацию об участке белка или рРНК, вовлеченном в выполнение рибосомой данной функции. Эти методы неприменимы к рибосомам эукариот, для которых пока не найдено подходов к такой сборке.

### Глава 5. Функциональные центры рибосомы и принципы их организации

В этом разделе кратко рассмотрим структурную организацию рибосом на примере рибосом прокариот, которые изучены более детально. Функциональные центры рибосомы включают:

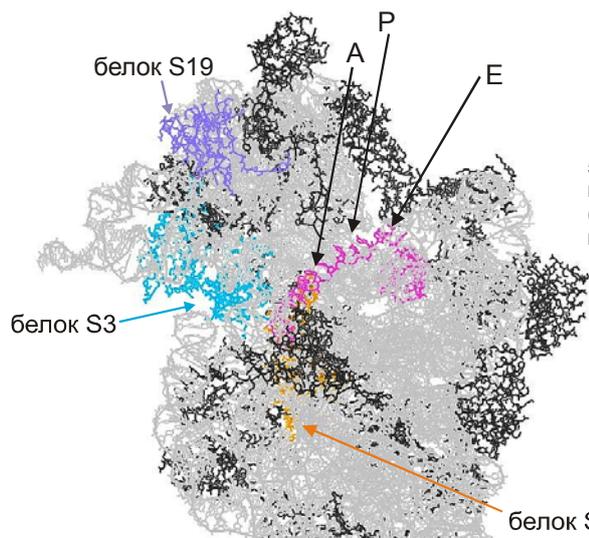
- 1) участки связывания каждого из участников процесса трансляции (для молекул тРНК – их три – А-, Р- и Е-участки);
- 2) декодирующий центр, где рибосома распознает «правильный» комплементарный комплекс кодона мРНК с антикодоном аа-тРНК в А-участке;
- 3) пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), где происходит катализ образования пептидной связи при элонгации и гидролиз сложноэфирной связи между синтезированным пептидом и тРНК при терминации;
- 4) так называемый ГТРаза-активирующий центр (ГАЦ), который отвечает за стимуляцию ГТРазной активности факторов трансляции;
- 5) участки связывания факторов трансляции.

Все три *mРНК-связывающих центра* расположены на контактных (обращенных друг к другу) поверхностях субчастиц так, что антикодоновые шпильки тРНК находятся на малой субчастице, а остальные части молекул, включая акцепторные концы, – на большой субчастице. При этом антикодон аа-тРНК взаимодействует с кодоном мРНК в декодирующем центре, 3'-концы молекул тРНК в А и Р-участках сближены в районе ПТЦ так, что между аа-тРНК в А-участке и пептидил-тРНК в Р-участке может образоваться пептидная связь. Молекула деацелированной тРНК в Е-участке расположена на некотором удалении от тесно соседствующих друг с другом молекул тРНК в А- и Р-участках, и ее 3'-конец находится вдали от ПТЦ. Во всех трех тРНК-связывающих центрах молекулы тРНК контактируют в основном с эволюционно консервативными фрагментами рРНК обеих субчастиц, тогда как с белками у них есть лишь единичные контакты. Следует отметить, что малая субчастица может связывать две молекулы тРНК (одну в А-участке, а другую – в Р-участке), а большая субчастица – только одну молекулу деацелированной тРНК в Е-участке. Это обусловлено тем, что принципиальный вклад в это связывание вносит 3'-концевой остаток рибозы, который и обеспечивает связывание тРНК с большой субчастицей. Соответственно полная рибосома способна связывать до трех молекул тРНК.

*мРНК-связывающий центр* расположен на «шее» малой субчастицы между ее «головой» и «телом» (рис. 2.21). В процессе трансляции на рибосоме находятся не только кодоны, взаимодействующие с тРНК в А- и Р-участках, но и примерно по 15 нуклеотидов мРНК с 3'- и с 5'-сторон от этих кодонов. Большая часть мРНК-связывающего центра находится на контактной поверхности субчастицы, места входа мРНК в рибосому и выхода из нее расположены на ее внешней стороне. мРНК-связывающий центр образован в большей степени эволюционно консервативными фрагментами рРНК малой субчастицы, рибосомные белки взаимодействуют с мРНК преимущественно в местах ее входа и выхода из рибосомы; на эукариотической рибосоме белки играют большую роль в организации мРНК-связывающего центра, особенно участка связывания части мРНК с 5'-стороны от кодона в Р-участке (см. п. 4.4.2).

*Декодирующий центр* образован несколькими нуклеотидами рРНК малой субчастицы (в 16S рРНК *E.coli* это G530, C1054, A1492 и A1493). Некоторые из них удалены друг от друга в первичной и вторичной структуре, но сближены в пространстве. Рибосомные белки непосредственного участия в декодировании не принимают (по крайней мере, у прокариот), но некоторые из них необходимы для поддержания правильной структуры рРНК в районе декодирующего центра, поэтому мутации в них могут влиять на точность декодирования.

вид со стороны контактной поверхности



вид с внешней стороны

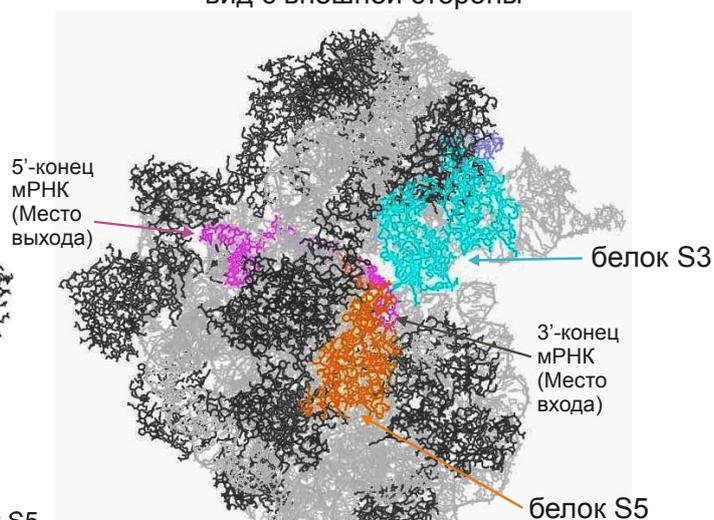


Рис. 2.21. Модель расположения мРНК на 30S субчастице, вычлененная из модели комплекса 70S рибосомы с мРНК и тРНК, полученной с помощью PCA [22]. Серый цвет – 16S рРНК, черный – белки (некоторые белки выделены разными цветами). Цепь мРНК выделена сиреневым цветом. Стрелками указаны кодоны в А-, Р- и Е-участках

В частности, аминокислотные остатки белка S12 в положениях 50 и 48 взаимодействуют с остатком рибозы третьего нуклеотида кодона в А-участке и остатком A1492 16S рРНК соответственно (рис. 2.22 *b, c*). Мутации по этим остаткам белка S12 значительно повышают точность трансляции и придают бактерии устойчивость к антибиотику стрептомицину, вызывающему повышенный уровень ошибок трансляции. Нуклеотиды рРНК, формирующие декодирующий центр, находятся в самых консервативных фрагментах структуры рРНК, составляющих консервативный «кор» (ядро) малой субчастицы рибосомы. Декодирующий центр узнает «правильный» кодон-антикодовый комплекс по его геометрии, как ключ узнает замок. Энергия даже «правильного» кодон-антикодового взаимодействия сама по себе очень мала и зависит от последовательностей кодона и антикодона. Поэтому правильная aa-тРНК закрепляется в А-участке не самим кодон-антиконовым взаимодействием, а рибосомой, воспринимающей узнавание правильного комплекса как сигнал, который «включает» значительные структурные изменения рибосомы, приводящие в конечном счете к закреплению тРНК. В случае узнавания рибосомой правильного кодон-антикодового дуплекса, комплекс aa-тРНК с EF-Tu и GTP стабилизируется на рибосоме, и конформационный сигнал передается из декодирующего центра на малой субчастице в GTPазо-активирующий центр на большой субчастице, что приводит к активации

ГТРазной активности фактора, гидролизу ГТР и закреплению aa-тРНК в А-участке таким образом, что ее аминокислотный остаток оказывается в ПТЦ. В случае маловероятного, но возможного попадания неправильной aa-тРНК в А-участок происходит ее «отбраковка» на кинетическом уровне – скорость ее диссоциации из рибосомы намного больше, чем «правильной» aa-тРНК. Узнающая система в целом работает очень точно. Вероятность включения неправильной аминокислоты в полипептидную цепь – примерно 1 на  $10^4$ .

Детальная схема взаимодействия кодон-антикодонного комплекса с декодирующим центром бактериальной рибосомы, полученная на основании данных РСА (рис. 2.22) показывает, каким образом рибосома «различает» правильный кодон от «близкого к правильному», т. е. такому, где в первом или втором положении находится нуклеотид, способный образовать с соответствующим нуклеотидом антикодона тРНК комплементарную пару, но не такую, как в случае «правильного». В случае «близкого к правильному» кодона (рис. 2.22, *d*) сеть водородных связей между кодон-антиконовым дуплексом и нуклеотидом А1493 рРНК будет не такой, как в случае «правильного», и образование «неправильных» водородных связей не приведет к «схлопыванию» фрагмента субчастицы (*domain closure*) вокруг дуплекса. Именно это «схлопывание» в случае «правильного» дуплекса запускает каскад конформационных изменений, которые в конечном счете приводят к закреплению «правильной» aa-тРНК в А-участке рибосомы.

*Участки связывания факторов трансляции.* Факторы элонгации и терминации взаимодействуют с рРНК и белками обеих субчастиц, в основном в области их контактной поверхности. Участки связывания этих факторов перекрываются, поэтому одновременно на рибосоме может находиться только один из факторов. Участки связывания всех факторов трансляции, расщепляющих ГТР (у прокариот – IF2, EF-Tu, EF-G и RF3), имеют один элемент, общий для всех – так называемый *ГТРаза-активирующий центр*. Он расположен на большой субчастице и образован эволюционно консервативными фрагментами 23S рРНК (в районе так называемой «сарцин-рициновой петли») и рибосомными белками стержня большой субчастицы – L10 и L7/L12 (их гомологи у эукариот называются соответственно P0 и P1/P2). При связывании факторов трансляции с рибосомами иногда имеет место *молекулярная мимикрия*. Так, структура факторов терминации трансляции RF1/2/eRF1 по форме и размерам напоминают L-образную молекулу тРНК; благодаря этому рибосома может связать в А-участке фактор терминации вместо aa-тРНК, когда в А-участок попадает стоп-кодон.

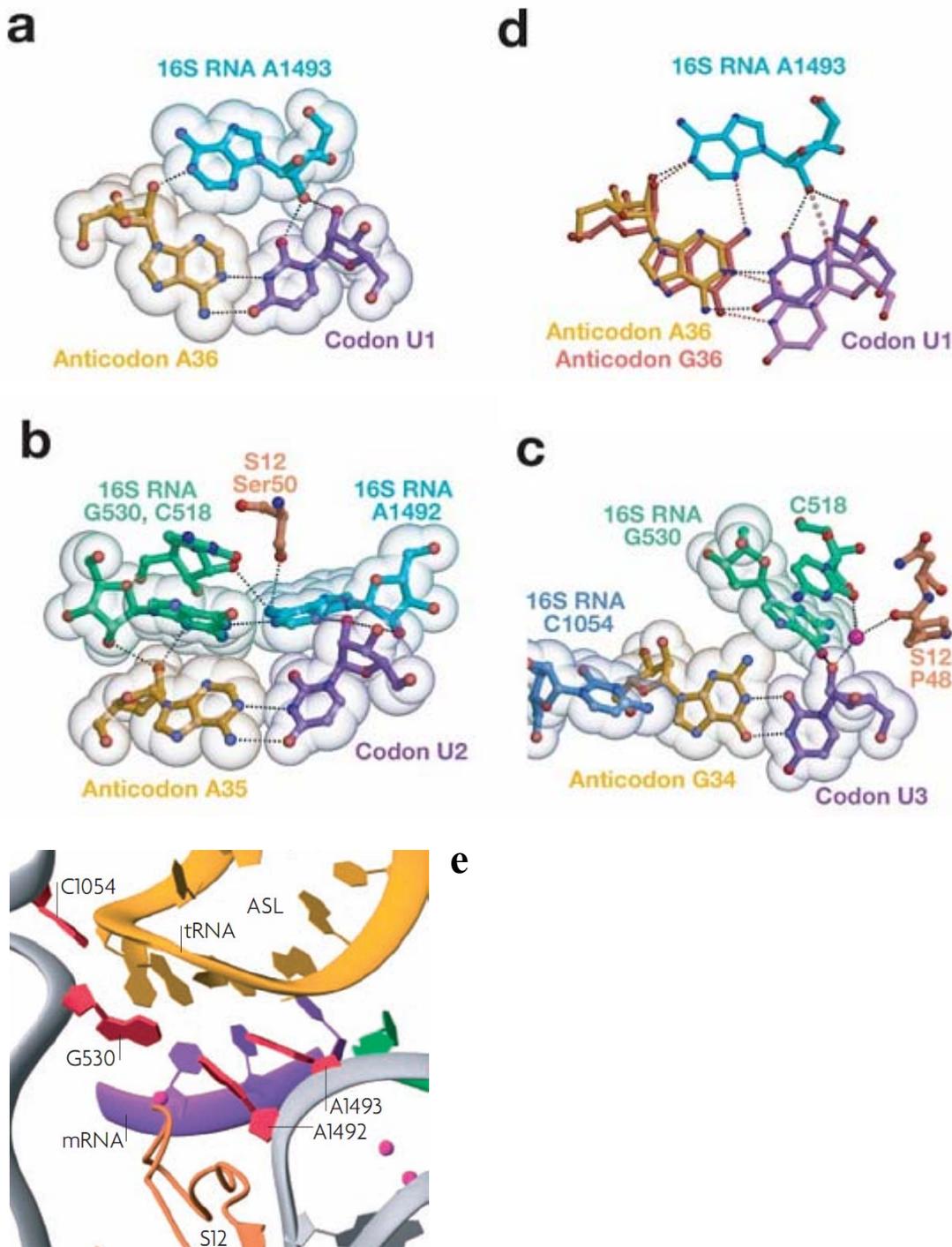


Рис. 2.22. Узнавание кодон-антикодонового комплекса рибосомой (*a-d*) и строение декодирующего центра рибосомы (*e*). Панели *a*, *b* и *c* представляют расположение соответственно первой, второй и третьей пары оснований, образованных между фенилаланиновым кодоном UUU и антикодоном GAA тРНК<sup>Phe</sup> в декодирующем центре [23]. Структурные элементы рибосомы более тесно контактируют с первыми двумя парами, чем с третьей (которая находится в «воббл»-положении). На панели *d* представлены взаимодействия пары оснований UG в случае, если вместо тРНК<sup>Phe</sup> в А-участке рибосомы связана тРНК<sup>Leu</sup> (антикодон GAG). «Правильная» пара UA показана на этой же панели для сравнения. На панели *e* представлена полная схема расположения кодон-антикодонового комплекса в декодирующем центре [24]. Желтым цветом отмечена антикодоновая шпилька тРНК (ASL, anticodon stem-loop), сиреневым – кодон мРНК (mRNA), серым – остов рРНК, красным – нуклеотиды рРНК, формирующие декодирующий центр, розовым – белок S12

*Пептидилтрансферазный центр* образован несколькими нуклеотидами домена V 23S рРНК, которые удалены друг от друга в первичной и вторичной структуре, но сближены в пространстве (рис. 2.23). Эти нуклеотиды находятся в самых консервативных фрагментах структуры 23S рРНК. Таким образом, ПТЦ, осуществляя катализ образования пептидной связи (или транспептидацию), действует как своеобразный рибозим [24]. Рибосомные белки участвуют в поддержании правильной ориентации 3'-концевых фрагментов молекул тРНК в А- и Р-участках, необходимой для образования пептидной связи, но удалены от ПТЦ и в катализе участия не принимают. До недавнего времени считалось, что в структурной организации ПТЦ у прокариот и эукариот существенных различий нет и устройство этого функционального центра рибосом наиболее консервативно. Однако при использовании аффинной модификации рибосом человека аналогом тРНК, несущим сшивающую группу на 3'-конце, в районе ПТЦ обнаружен рибосомный белок L36AL, не имеющий гомологов среди бактериальных рибосомных белков [25]. Какую роль играет этот белок в ПТЦ, пока не ясно.

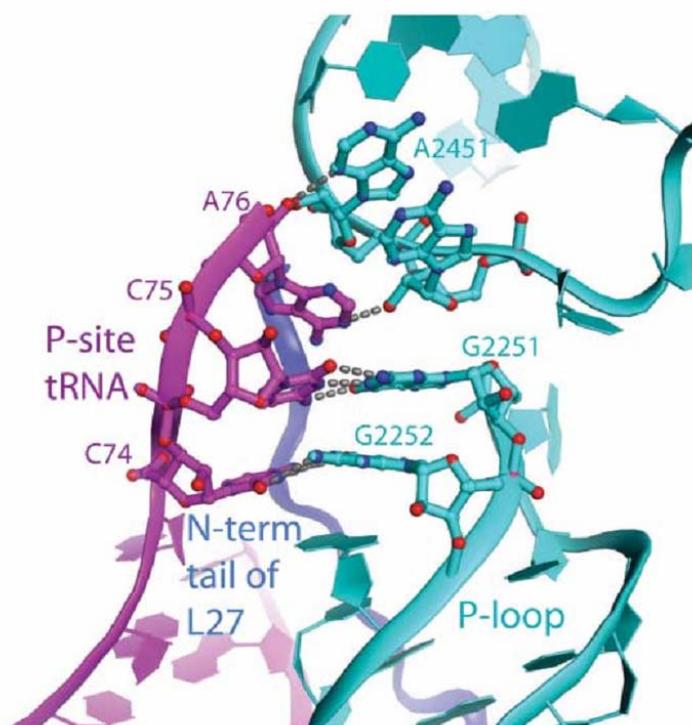


Рис. 2.23. Схема взаимодействия 3'-концевой части молекулы тРНК в Р-участке с рибосомой по данным РСА. Зеленым цветом выделена 23S рРНК, подписаны номера ее нуклеотидов в районе ПТЦ. Ярко-сиреневым цветом выделена 3'-концевая часть тРНК (отмечены нуклеотиды ее ССА-конца - С74, С75 и А76), бледно-розовым цветом отмечена N-концевая часть белка L27, взаимодействующая с акцепторным стеблем тРНК [26]

В заключение следует отметить, что рибосома является очень динамичной структурой и в процессе работы может претерпевать *крупномасштабные изменения*. Одно из таких изменений, как уже отмечалось, происходит при узнавании правильного кодон-антикодонного дуплекса аа-тРНК с кодоном мРНК в А-участке. При этом малая субчастица принимает так называемую «закрытую» конформацию, в которой «голова» малой субчастицы наклоняется к

телу и к большой субчастице, что и запускает цепь конформационных перестроек, приводящих, в конечном счете, к активации ГТРазной активности фактора EF-Tu. Из других конформационных изменений наиболее значительными являются так называемые «шестеренкоподобные» движения (ratchet-like movement). При связывании EF-G голова малой субчастицы поворачивается определенным образом относительно тела, а после транслокации и ухода деацилированной тРНК – возвращается в исходное положение. Движения регулярно повторяются в каждом цикле элонгации, поэтому их и назвали «шестеренкоподобными», или «движения, подобные храповику (другой вариант перевода оригинального англоязычного термина). Динамичность структуры рибосомы важна для ее работы. В качестве примера можно привести действие растительного алкалоида ризицина, который расщепляет одну-единственную фосфодиэфирную связь в 23S рРНК в так называемой «сарцин-рициновой» петле (район ГТРаза-активирующего центра), что лишает рРНК конформационной подвижности и в результате приводит к полной инактивации всей огромной рибосомы.

## **Глава 6. Рибосома и антибиотики**

Антибиотики – низкомолекулярные вещества природного или синтетического происхождения, подавляющие рост клеток (чаще всего – клеток бактерий). В настоящее время известны тысячи антибиотиков, относящихся к различным классам веществ. Те антибиотики, которые подавляют рост бактериальных клеток избирательно (почти не затрагивая клетки эукариот), широко применяются для лечения заболеваний, вызванных патогенными бактериями. Мишенью действия многих антибиотиков является рибосома [27]. Исследования участков связывания антибиотиков на рибосоме в «дорентгеновскую» эпоху (в 80–90-х гг. XX века) с помощью аффинной модификации и футпринтинга показали, что эти участки совпадают с основными функциональными центрами рибосомы – на малой субчастице с декодирующим и тРНК-связывающими центрами, а на большой – с ПТЦ, участком связывания растущего пептида («пептидным тоннелем») и ГТРаза-активирующим центром. Строение участков связывания антибиотиков и молекулярные механизмы их ингибирующего действия установлены с помощью РСА при расшифровании на атомном уровне структуры комплексов антибиотиков с рибосомами.

Наиболее хорошо изучено взаимодействие аминогликозидных и макролидных антибиотиков с декодирующим центром рибосомы. В качестве примера представим структуры трех антибиотиков класса аминогликозидов (рис. 2.24).

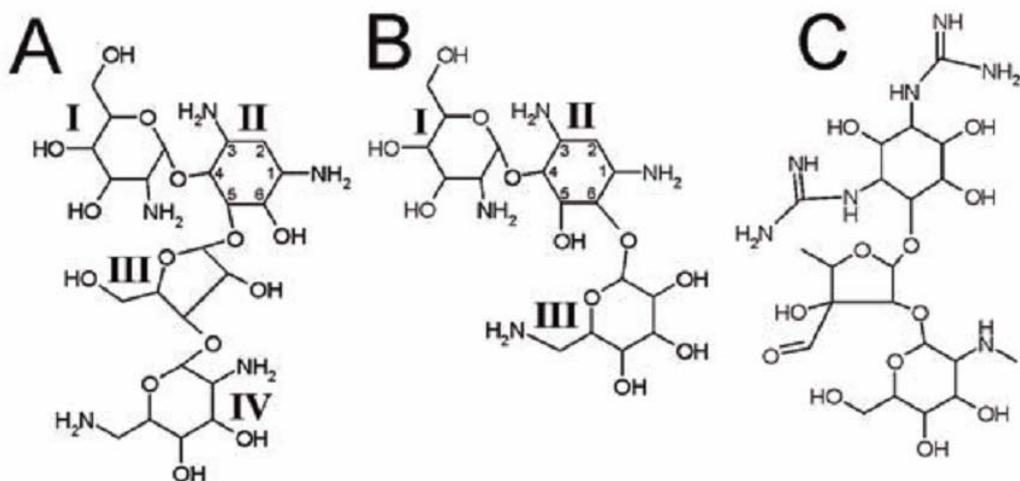


Рис. 2.24. Структуры аминогликозидных антибиотиков неомицина (А), канамицина (В) и стрептомицина (С)

Аминогликозиды узнают с высокой специфичностью структуру декодирующего центра 16S рРНК (по принципу «ключ-замок»), в результате чего рибосома перестает распознавать «правильную» аминоацил-тРНК и резко возрастает частота включения «неправильных» аминокислотных остатков в синтезируемый белок. Кольцо I антибиотиков вступает в стэкинг с нуклеотидом G1491 и образует водородные связи с A1408, благодаря чему два других нуклеотида 16S рРНК (A1492 и A1493), ответственные за отбор правильного кодон-антикодонного дуплекса, оказываются в конформации, неспособной выполнять функцию отбора. Кольца III и IV вовлечены во взаимодействия с другими нуклеотидами рРНК в районе декодирующего центра, которые отличаются у разных антибиотиков и отвечают за тонкие характерные особенности их действия.

Макролиды, содержащие 14-16-членное лактоновое кольцо, остатки сахара и боковые заместители (см. рис. 2.25), взаимодействуют с нуклеотидами 23S рРНК, образующими ближайшую к ПТЦ часть «пептидного канала», и тем самым останавливают синтез белка на стадии образования пептида длиной в несколько аминокислотных остатков. Лактоновое кольцо антибиотиков взаимодействует с «пептидным каналом», а остатки сахаров – с консервативными нуклеотидами A2058 и A2059 23S рРНК, входящими в состав ПТЦ. Этим объясняются полученные ранее данные о том, что метилирование указанных остатков 23S рРНК приводит к устойчивости к действию антибиотиков.

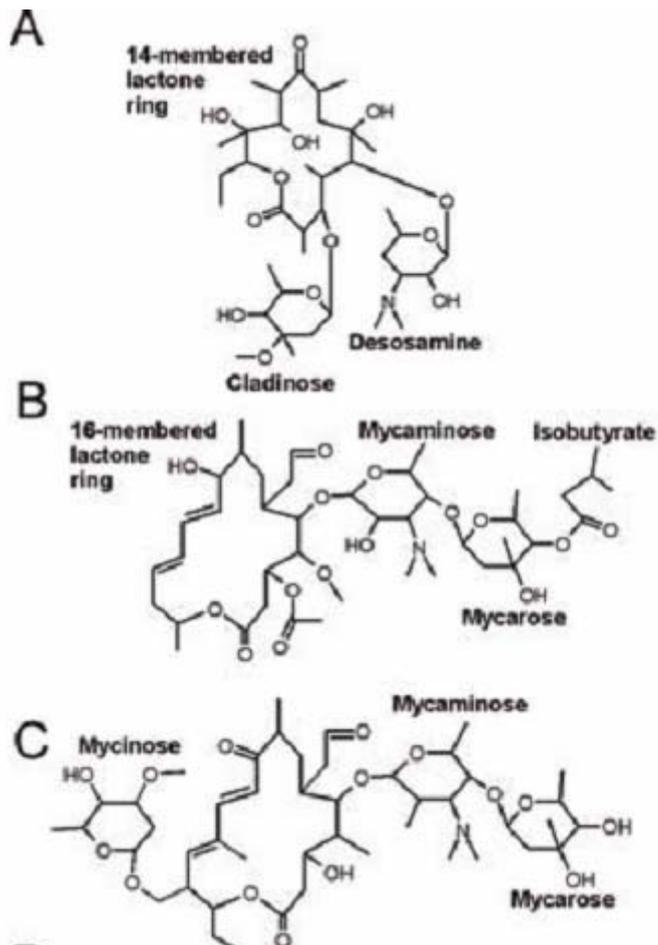
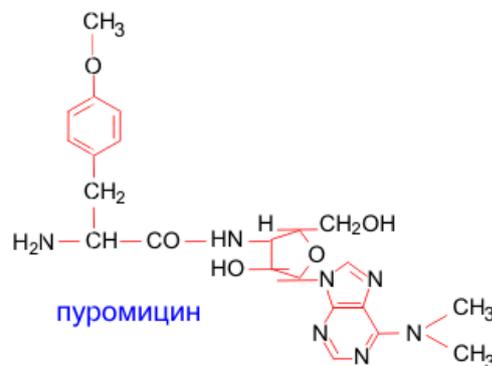


Рис. 2.25. Структуры макролидных антибиотиков эритромицина (А), иозамицина (В) и тилозина (С)

Следует отметить, что антибиотики, мишенью которых является рибосома, обычно селективно блокируют какую-либо одну определенную стадию процесса трансляции (например, циклогексимид и эметин блокируют транслокацию, анизомицин – транспептидацию и пр.). Большую роль в изучении связывания тРНК с рибосомой сыграл антибиотик пурамицин, являющийся аналогом 3'-концевого фрагмента аминоктил-тРНК:



Он способен связываться в акцепторный участок ПТЦ вместо аминоктил-тРНК и образовывать пептидную связь с пептидил-тРНК, находящейся в Р-участке. В

результате транспептидации пептидный остаток переносится с тРНК на пурамицин и синтез белка прерывается. Пептидил-пурамицин легко диссоциирует с рибосомы, и его можно обнаружить различными методами, если пептидный остаток несет радиоактивную или иную метку. Пурамицин до сих пор широко используется в исследовательской работе для того, чтобы определить, связана ли пептидил-тРНК в Р-участке рибосомы.

На рис. 2.26 в качестве примера приведены участки связывания некоторых антибиотиков на 50S субчастице в районе ПТЦ и вблизи участка, предназначенного для синтезированного пептида («exit tunnel»).

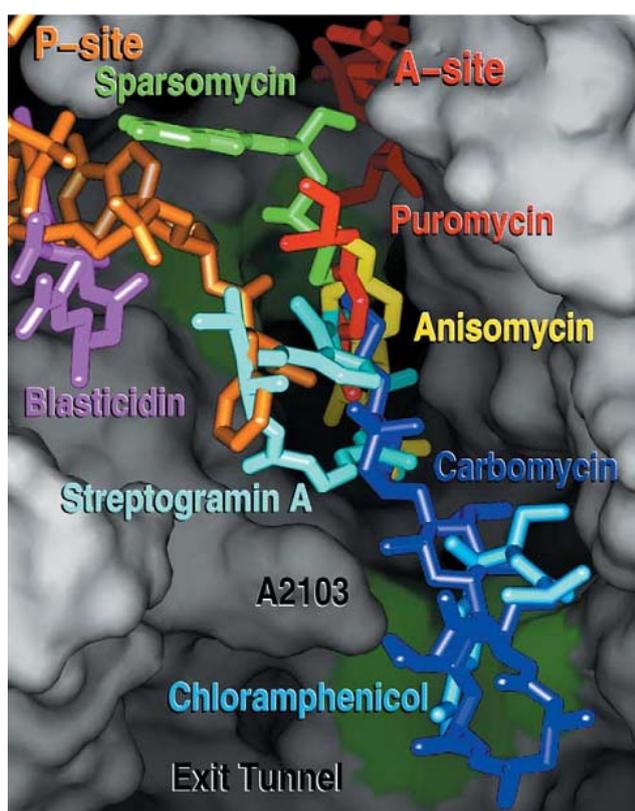


Рис. 2.26. Структуры некоторых антибиотиков, наложенные на их участки связывания во фрагменте 50S субчастицы в районе ПТЦ. Срез субчастицы, обращенный к малой субчастице, окрашен в серый цвет. Оранжевым цветом показан модельный 3'-концевой фрагмент пептидил-тРНК в Р-участке (ССА-Phe-остаток каприловой кислоты-биотин) [28]

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Graifer D. M., Nekhai S. Yu., Mundus D. A., Fedorova O. S., Karpova G. G. Interaction of human and *Escherichia coli* tRNA<sup>Phe</sup> with human 80S ribosomes in the presence of oligo- and polyuridylylate template // *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 1992. Vol. 1171. P. 56–64.
2. Rodnina M. V. and Wintermeyer W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes // *Current Opinion in Cell Biology*. 2009. Vol. 21. P. 435–443.
3. Pisarev A. V., Shirokikh N. E. and Hellen C. U. T. Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites // *C.R. Biologies*. 2005. Vol. 328. P. 589–605.
4. Locker N., Easton L. E. and Lukavsky P. J. HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly // *EMBO J*. 2007. Vol. 26. P. 795–805.
5. Babaylova E., Graifer D., Malygin A., Stahl J., Shatsky I. and Karpova G. Positioning of subdomain III<sub>d</sub> and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome // *Nucleic Acids Res*. 2009. Vol. 37. P. 1141–1151.
6. Allmang C., Wurth L., Krol A. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1790. P. 1415–1423.
7. Liang H., Wong J. Y., Bao Q., Cavalcanti A. R. O., Landweber L. F. Decoding region: analysis of eukaryotic release factor (eRF1) stop codon binding residues // *J. Mol. Evol*. 2005. Vol. 60. P. 337–344.
8. Halic M., Gartmann M., Schlenker O., Mielke T., Pool M. R., Sinning I. and Beckmann R. Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site // *Science*. 2006. Vol. 312. P. 745–747.
9. Spahn C. M. T., Beckmann R., Eswar N., Penczek P. A., Sali A., Blobel G., Frank J. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* – tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions // *Cell*. 2001. Vol. 107. P. 373–386.
10. Gerbi, S. A. Expansion segments: Regions of variable size that interrupt the universal core secondary structure of ribosomal RNA // In: *Ribosomal RNA: Structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis* (Zimmermann, R. A., and Dahlberg, A. E., Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL., 1996. P. 71–87.
11. Wilson D. N. and Nierhaus K. H. Ribosomal proteins in the spotlight // *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2005. Vol. 40. P. 243–267.
12. Малыгин А. А., Бочкаева З. В., Бондаренко Е. И., Косинова О. А., Локтев В. Б., Шатский И. Н., Карпова Г. Г. (2009) Связывание IRES-элемента РНК вируса гепатита С с 40S субчастицей рибосомы: роль белка р40 // *Молекуляр. биология*. Т. 43. С. 1070–1076.

13. Warner J. R., McIntosh K. B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? // *Mol Cell*. 2009. Vol. 34. P. 3–11.
14. Малыгин А. А., Бондаренко Е. И., Иванисенко В. А., Протопопова Е. В., Карпова Г. Г., Локтев В. Б. Картирование рецепторного домена для вирусов венесуэльского энцефалита лошадей и клещевого энцефалита на С-конце ламининсвязывающего белка человека // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 1631–1641.
15. Brodersen, D. E., Clemons, W. M. Jr., Carter, A. P., Wimberly, B. T. and Ramakrishnan, V. Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S rRNA // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 316. P. 725–768.
16. Moazed D., Noller H. F. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome // *Nature*. 1989. Vol. 342. P. 142–148.
17. Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г. Структурно-функциональная топография рибосом *E.coli* по данным аффинной модификации реакционноспособными аналогами мРНК и тРНК // *Успехи биологической химии*. 1991. Т. 32. С. 3–49.
18. Карпова Г. Г. Химические аспекты комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот // *Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук*. 1987. Т. 12. С. 82–95.
19. Pisarev A. V., Kolupaeva V. G., Yusupov M. M., Hellen C. U. T, Pestova T. V. Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes // *EMBO J*. 2008. Vol. 27. P. 1609–1621.
20. Graifer, D., Molotkov, M., Styazhkina, V., Demeshkina, N., Bulygin, K., Eremina, A., Ivanov, A., Laletina, E., Ven'yaminova, A. and Karpova, G. Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites // *Nucleic Acids Res*. 2004. Vol. 32. P. 3282–3293.
21. Khairulina J., Graifer D., Bulygin K., Ven'yaminova A., Frolova L., Karpova G. Eukaryote-specific motif of ribosomal protein S15 neighbors A site codon during elongation and termination of translation // *Biochimie*. 2010. Vol. 92. P. 820–825.
22. Yusupova G., Jenner L., Rees B., Moras D., Yusupov M. Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome // *Nature*. 2006. Vol. 444. P. 391–394.
23. Ogle J., Ramakrishnan V. Structural insights into translational fidelity // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. Vol. 74. P. 129–177.
24. Steitz T. A. A structural understanding of the dynamic ribosome machine // *Nature reviews/Mol. Cell. Biol.* 2008. Vol. 9. P. 242–253.
25. Baouz S., Woisard A., Sinapah S., Le Caer J.-P., Argentini M., Bulygin K., Aguié G., Hountondji C. The human large subunit ribosomal protein L36A-like contacts the CCA end of P-site bound tRNA // *Biochimie*. 2009. Vol. 91. P. 1420–1425.
26. Selmer M., Dunham C. M., Murphy IV F. M., Weixlbaumer A., Petry S., Kelley A. C., Weir J. R. and Ramakrishnan V. Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA // *Science*. 2006. Vol. 313. P. 1935–1942.

27. Tenson T. and Mankin A. Antibiotics and the ribosome // Mol. Microbiol. 2006. Vol. 59. P. 1664–1677.
28. Moore P. B., Steitz T. A. The ribosome revealed // Trends Biochem Sci. 2005. Vol. 30. P. 281–283.