

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи



МАКАРОВА Татьяна Михайловна

**ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ
ЯВЛЕНИЙ
В БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЕ
МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Специальность 02.00.10 — биоорганическая химия

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор, академик РАН
Богданов А.А.

Москва 2020

Оглавление

1	Введение	3
2	Обзор литературы	10
2.1	Рибосома как рибонуклеопротеиновый комплекс	10
2.1.1	Структурные свойства и вариативность рибосомы	10
2.1.2	Вторичная и третичная структура рРНК	15
2.1.3	Минимальная рибосома	19
2.2	Аллостерические явления в рибосоме	24
2.2.1	Понятие аллостерии в биологических макромолекулах	24
2.2.2	Аллостерическая регуляция связывания тРНК различными сайтами рибосомы	29
2.2.2.1	А–сайт рибосомы	29
2.2.2.2	Потенциальная аллостерическая связь между А– и Е–сайтами связывания тРНК	30
2.2.2.3	Аллостерическая регуляция декодирования и отбора антикодона тРНК.	34
2.2.3	Аллостерическая регуляция пептидилтрансферазной реакции.	36
2.2.3.1	Остановка трансляции растущим пептидом в РТ	39
2.2.4	Аллостерические эффекты в процессе транслокации.	42
2.2.4.1	Взаимодействие L1 протуберанца с тРНК	42
2.2.4.2	Взаимодействие претранслокационного состояния рибосомы с элонгационным фактором G	46
2.2.4.3	Отдельные свидетельства существования в рибосоме аллостерических взаимосвязей.	47
2.2.5	Заключение	49

3	Результаты и их обсуждение	52
3.1	Введение	52
3.2	Конформация А-сайта большой субъединицы рибосомы при связывании тРНК в А- и Е-сайтах	55
3.2.1	Малая субъединица рибосомы и ее роль в антагонизме А- и Е-сайтов	63
3.3	Связывание тРНК в Е-сайте 50S субъединицы рибосомы	67
3.4	Взаимодействие А- и Е- сайтов рибосомы	70
3.5	Мутации в 23S рРНК, снижающие сродство тРНК к А-сайту	77
3.5.1	Мутация A2531U	81
3.5.2	Мутация UU2492-3C	83
3.5.3	Степень модификации оснований рРНК: влияние мутаций	87
3.6	Влияние пептидов в РТ на Е-тРНК	89
3.7	Предположительный механизм воздействия антибиотиков, связывающихся в РТ, на А-сайт	92
3.7.1	Эритромицин	93
3.7.2	Хлорамфеникол в неканонической позе	96
3.7.3	Заключение	98
4	Методы	100
4.1	Моделируемая система	100
4.2	Условия докинга и молекулярно-динамического моделирования	103
4.3	Методы анализа траекторий	104
5	Выводы	107

Список сокращений

В работе использованы трехбуквенные обозначения аминокислотных остатков в соответствии с номенклатурой Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного союза биохимиков (IUB), а также следующие сокращения: aa-тРНК — аминоацелированная тРНК.

ГТФ — гуанозинтрифосфат.

ДЦ — декодирующий центр.

МД — молекулярная динамика.

ПТЦ — пептидилтрансферазный центр.

ПТР — пептидилтрансферазная реакция.

РТ — рибосомный туннель.

РСА — рентгеноструктурный анализ.

ASM — 35-ти нуклеотидный олигомер, имитирующий акцепторный стебель aa-тРНК, конкретно — ее универсальный 3'-фрагмент.

СМСТ — 1-циклогексил-(2-морфолино-этил)-карбодимид мето-*p*-толуол сульфат. Реагент для зондирования структуры нуклеиновых кислот. Образует конъюгат с депротонированным N3 урацила (U) или, в меньшей степени, N1 гуанина (G) посредством нуклеофильной атаки со стороны плоскости азотистого основания.

DMS — диметилсульфат. Реагент для зондирования структуры нуклеиновых кислот. Метилирует N1 аденина (A) и N3 цитозина (C).

EF-Tu — элонгационный фактор Tu, участвует в аккомодации aa-тРНК.

EF-G — элонгационный фактор G, участвует в транслокации рибосомы.

FRET — Förster resonance energy transfer, безизлучательный перенос энергии по Фёрстеру. Метод определения меж- и внутри-молекулярных расстояний, основанный на изменении степени переноса энергии между люминофорами в зависимости от расстояния между ними.

GAC — GTPase associated center, центр связывания ГТФаз, H42-44 23S рРНК и

рибосомные белки L10 и L11.

MSD — Mean Square Displacement, среднее квадратичное смещение. Численная оценка смещения группы атомов от её исходного положения.

ORF — открытая рамка считывания мРНК.

RMSD — Root Mean Square Displacement, корень среднего квадратичного смещения. Численная оценка смещения группы атомов от её исходного положения.

RMSF — Root Mean Square Fluctuation, среднее квадратичное смещение. Численная оценка подвижности атома.

SRC — stalled ribosomal complex, остановленный рибосомный комплекс. Состояние рибосомы с остановленной ПТР.

smFRET — single molecule Förster resonance energy transfer, FRET отдельных молекул.

Глава 1

Введение

Актуальность работы

Рибосома в современном представлении есть молекулярная машина, которая через последовательную смену состояний синтезирует все клеточные белки согласно нуклеотидной последовательности матричной РНК (мРНК). Переходы рибосомы между различными конформационными состояниями в ходе этого процесса осуществляются через скоординированные изменения структуры самой рибосомы и связанных с ней лигандов — транспортных РНК (тРНК), матричной РНК (мРНК) факторов трансляции, вновь синтезируемых пептидов в рибосомном туннеле (РТ). На определенные стадии этого процесса могут также влиять малые эффекторы, антибиотики, а также мутации или модификации нуклеотидных остатков рРНК, которые зачастую действуют аллостерически. Существует множество экспериментальных свидетельств того, что функциональные центры рибосомы регулируются из участков, удаленных на десятки ангстрем и иногда находящихся в другой молекуле или даже субъединице комплекса, то есть аллостерически.

Чтобы проникнуть в детали, лежащие в основе работы рибосомы, необходимо получить динамическую картину процесса трансляции на уровне отдельных остатков рибосомных РНК (рРНК) и белков и их нековалентных взаимодействий. Существующие экспериментальные методы предоставляют полезную и достаточно сложную картину связности тех или иных остатков на определенных стадиях работы рибосомы, тем не менее оставляя неясными структурные основы наблюдаемых явлений. При этом структурные методы исследования рибосомы — рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия — при анализе комплекса с молекулярной массой 2,5MD позволяют получить, как правило,

усредненную и статичную структуру определенных состояний комплекса, зафиксированную при температурах жидкого азота. Этого далеко не достаточно, чтобы понять природу аллостерической регуляции работы рибосомы, поскольку этот тип регуляции подразумевает, что тот или иной макромолекулярный комплекс имеет несколько конформационных состояний, находящихся в динамическом равновесии, что и обеспечивает его изменчивость и восприимчивость к внешним сигналам.

Существующие проблемы на данном этапе способен в известной мере разрешить метод молекулярно-динамического моделирования (МД), способный *in silico* описать внутримолекулярную подвижность биополимеров в растворе при заданной температуре. В последние годы этот метод стали неоднократно применять к такому сложному объекту, как рибосома. При этом были получены многообещающие результаты.

Транспортные РНК (тРНК), осуществляющие доставку аминокислот в пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) для пептидилтрансферазной реакции (ПТР), в ходе выполнения своей функции последовательно занимают три канонических сайта рибосомы: А- (aminocyl), Р- (peptidyl) и Е- (exit) сайты. В А-сайте аминоацилированная тРНК (aa-тРНК) связывается непосредственно перед ПТР, в ходе которой вновь синтезированный пептид с Р-тРНК переместится на аминогруппу вновь привнесенного аминокислотного остатка на А-тРНК. В Е-сайт доставляется деацилированная тРНК из Р-сайта с тем, чтобы после этого покинуть рибосому.

Достоверно известно, что связывание тРНК в А-сайте подвергается аллостерическому воздействию эффекторов, связывающихся в самых разных функциональных участках рибосомы: это и тРНК в Е-сайте, и мутации в 23S рРНК бактериальной рибосомы, и, с высокой долей вероятности, пептиды и антибиотики, связывающиеся в РТ.

Степень разработанности проблемы

К настоящему моменту есть свидетельства того, что А- и Е-тРНК являются антагонистами, что проявляется особенно четко на первых циклах элонгации. Механизм передачи аллостерического сигнала, обеспечивающего этот антагонизм до сих пор не ясен.

Ровно так же остается непонятным механизм многократно наблюдавшегося в различных экспериментах явления остановки пептидилтрансферазной реакции (ПТР), хотя есть обоснованные предположения, что он связан с изменением способности А-сайта к связыванию тех или иных аминоацил-тРНК (aa-тРНК).

Цели и задачи работы

Целью настоящей работы было полноатомное молекулярно-динамическое моделирование 70S рибосомы *E. coli* в различных функциональных состояниях, чтобы ответить на ряд фундаментальных вопросов о механизме ее функционирования. Для осуществления этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Отработать протокол подготовки системы 70S рибосомы *E. coli* для молекулярно-динамического моделирования
2. Смоделировать поведение рибосомы в растворе при 310К в ее аллостерически антагонистичных состояниях: во-первых, связавшей тРНК в А/А- и Р/Р-сайтах (именуемое далее как АР-состояние), во-вторых, содержащей тРНК в Р/Р- и Е/Е-сайтах (здесь и далее — РЕ-состояние)
3. Выявить основные различия в нековалентных взаимодействиях остатков РНК между описанными состояниями и предложить на основании этого механизм передачи аллостерического сигнала
4. Изучить влияние пептида в рибосомном туннеле (РТ) на состояние Е-тРНК в молекулярно-динамической модели
5. Изучить влияние мутаций А2531U и UU2492-3С — аллостерических ингибиторов связывания А-тРНК — на систему в АР-состоянии и получить из этого общее представление о механизме инактивации А-сайта
6. Смоделировать комплексы рибосомы в АР-состоянии, содержащие антибиотики, связывающиеся в РТ с целью выявить механизм их воздействия на А-сайт и ПТЦ

Объект исследования — молекулярно-динамическая модель 70S рибосомы *E. coli*.

Предмет исследования — конформационный и аллостерический ответ 70S рибосомы *E. coli* на связывание различных лигандов и определенные мутации в 23S рРНК.

Научная новизна

Данная диссертационная работа, посвященная молекулярно-динамическому моделированию 70S рибосомы *E. coli*, представляет собой оригинальное научное

исследование. В ходе её выполнения впервые был разработан протокол предварительной оптимизации системы, позволяющий наблюдать воспроизводимые эффекты перераспределений нековалентных взаимодействий внутри целой рибосомы при воздействии тех или иных лигандов. Благодаря этому впервые было обнаружено взаимодействие А- и Е-сайтов большой субъединицы рибосомы через спираль H93. Аналогично впервые было показано участие в аллостерической связи с А-сайтом межсубъединичных мостов В7а, В2а/d и В3. Впервые показано, что сайт связывания С75 Е-тРНК по результатам анализа траекторий молекулярной динамики оказался основным фактором воздействия на А-сайт.

Новизной отличаются и данные, полученные относительно А-сайта большой субъединицы рибосомы: МД-моделирование впервые позволило обнаружить его “закрытую” конформацию, стерически противоречащую связыванию в ней тРНК. Эту конформацию сайт занимает в РЕ-состоянии, значительно в ее сторону он смещается при мутациях А2531U и UU2492-3С, известных своей способностью препятствовать связыванию А-тРНК.

Наконец, это же переключение А-сайта было обнаружено и при связывании в рибосомном туннеле антибиотиков хлорамфеникола и эритромицина.

Теоретическая значимость работы

Было продемонстрировано, что характер аллостерических взаимосвязей в крупных молекулах РНК осуществляется, главным образом, через перераспределение нековалентных взаимодействий остатков с повышенной конформационной вариабельностью вне стабильных двуспиральных структур.

Это следует учитывать при дальнейшем моделировании аллостерических явлений в системах, содержащих РНК.

Практическая значимость работы

Переключения А-сайта, обнаруженные в ходе данной работы, носят универсальный характер и обеспечивают способность рибосомы останавливать пептидилтрансферазную реакцию самыми разнообразными аллостерическими эффекторами.

Поэтому полученные в данной работе результаты следует учитывать при дизайне новых антибиотиков, нацеленных на подавление пептидилтрансферазной активности бактериальных рибосом.

Методология диссертационного исследования

При проведении вычислительных экспериментов использовался метод молекулярно-динамического моделирования с помощью пакета GROMACS 5.1.4 и силового поля

AMBER-ff14SB. Топологии для антибиотиков эритромицина хлорамфеникола были получены в силовом поле GAFF. Оптимизация геометрии и молекулярных электростатических потенциалов вновь параметризуемых остатков и молекул получались квантово-химическими расчетами методом Хартри-Фока с базисом 6-31G* в пакетах FIREFLY и ПРИРОДА.

Для первоначальной оценки положения вновь введенных лигандов (пептидов, хлорамфеникола) использовался метод докинга с помощью программы rDock на фрагменте рибосомы.

Анализ полученных траекторий осуществлялся как встроенными опциями пакета GROMACS, так и с помощью самостоятельно написанных программ на Python 2.7.

Личный вклад автора

Все вычислительные эксперименты выполнены лично автором. Оформление и обсуждение полученных результатов также выполнены лично автором.

Положения, выносимые на защиту

1. Построенная в данной работе молекулярно-динамическая модель хорошо согласуется с известными экспериментальными данными.
2. Антагонизм между А- и Е-сайтами большой субъединицы рибосомы осуществляется, главным образом, через воздействие, передающееся от С75 Е-тРНК на Н93, имеющую связи как с ПТЦ, так и с А-спиралью.
3. А-сайт большой субъединицы рибосомы может находиться в одной из двух конформаций: “открытой” с выпетливанием Ψ 2580 по направлению к РТ или “закрытой”, в которой стэкинг-взаимодействия между G2553-U2554-U2555 препятствуют связыванию тРНК.
4. Конформации межсубъединичных мостов В7а, В2а/d и В3 связаны с состоянием А-сайта, благодаря чему они участвуют в регуляции связывания с этим сайтом тРНК.
5. Переключение А-сайта между обнаруженными “открытой” и “закрытой” конформациями имеет универсальный характер, и, скорее всего, играет ключевую роль в остановке ПТР различными аллостерическими регуляторами.

Апробация работы

Результаты работы докладывались на 5 конгрессах и конференциях: The IX International Conference for Young Chemists “Mendeleev 2017” (Санкт-Петербург, Россия, 2015), International School-Seminar on Computer-Aided Molecular Design — устное сообщение (Казань, Россия, 2016), The X International Conference for Young Chemists “Mendeleev 2017” (Санкт-Петербург, Россия, 2017), Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences 2017, (Петергоф, Россия, Россия, 2017), 43th Congress of the Federation of European Biochemical Societies FEBS — устное сообщение (Прага, Чехия, 2018).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 5 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

Статьи по теме диссертации

1. *Shishkina A. V., Makarova, T. M., Tereshchenkov A. G., Makarov G. I., Korshunova G. A., Bogdanov A. A.* Modeling interactions of erythromycin derivatives with ribosomes // *Biochemistry (Moscow)*. — 2015. — Vol. 80, No. 11. — P. 1500-1507. IF=1,886.
2. *Makarov G. I., Makarova, T. M., Sumbatyan N. V., Bogdanov A. A.* Investigation of ribosomes using molecular dynamics simulation methods // *Biochemistry (Moscow)*. — 2016. — Vol. 81, No. 13. — P. 1579-1588. IF = 1,886.
3. *Makarova, T. M., Bogdanov A. A.* The ribosome as an allosterically regulated molecular machine // *Biochemistry (Moscow)*. — 2017. — Vol. 82, No. 13. — P. 1557-1571. IF = 1,886.
4. *Makarov G. I., Makarova, T. M.* A noncanonical binding site of chloramphenicol revealed via molecular dynamics simulations // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. — 2018. — Vol. 1862, No. 12. — P. 2940-2947. IF = 3,681.
5. *Makarova, T. M., Bogdanov A. A.* Allosteric regulation of the ribosomal A site revealed by molecular dynamics simulations // *Biochimie*. — 2019. — Vol. 167. — P. 179-186. IF = 3,362.

Тезисы докладов и материалы конференций

1. *Makarova, T.* Molecular dynamics study of allosteric signal transmission between E-site and elongation factor G binding site // IX International conference of young scientists on chemistry “Mendeleev 2015” Book of abstracts. — Saint Petersburg State University, 2015. — P. 261.
2. *Makarova, T.* Molecular-dynamics study of allosteric pathways in bacterial ribosome // International School-Seminar on Computer-Aided Molecular Design Book of abstracts. — Kazan, Russia, 2016. — P. 13.
3. *Makarov G., Makarova, T.M., Bogdanov A.* Investigation of nascent peptide exit tunnel by means of molecular dynamics simulations // International symposium “Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences”, St. Petersburg, September 7-10, 2017. — St.Petersburg: Petersburg Nuclear Physics Institute (PNPI) of the National Research Center “Kurchatov Institute”, 2017. — P. 9-10.
4. *Makarova, T.* Allosteric regulation of tRNAs binding to the ribosome revealed via molecular dynamics simulations // X International conference of young scientists on chemistry “Mendeleev 2017” Book of abstracts. — Saint Petersburg State University, 2017. — P. 382.
5. *Makarova, T.* Allosteric switches in bacterial ribosome revealed via molecular-dynamics simulations // FEBS Open Bio. Vol. 8. — Prague, Czech Republic, 2018. — P. 25. — (ShT.09-1).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на **125**-ти страницах машинописного текста и содержит **33** рисунка и **10** таблиц. Изложение работы включает в себя следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Результаты и их обсуждение, Методы, Выводы и Список литературы, содержащий **173** наименования.

Глава 2

Обзор литературы

2.1 Рибосома как рибонуклеопротеиновый комплекс

2.1.1 Структурные свойства и вариативность рибосомы

Как уже было сказано во введении, рибосома есть РНК-белковый комплекс, осуществляющий трансляцию — синтез всех белков клетки согласно информации, закодированной в последовательности матричной РНК(мРНК) [1; 2]. Для осуществления синтеза белка рибосома собирается из двух неравных субъединиц: малая субъединица связывает мРНК и, соединяясь с большой, последовательно отбирает тРНК на соответствие каждому кодону мРНК, посредством распознавания кодон-антикодовой структуры в декодирующем центре (ДЦ) [1; 3]. Большая же субъединица содержит пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), способный катализировать образование пептидной связи и в который поступает ССА-конец отобранной на соответствие кодону тРНК, несущий закодированную аминокислоту [4—7]. Растущая полипептидная цепь продвигается по рибосомному туннелю (РТ) к выходу из рибосомы, где она взаимодействует с белковыми факторами процессинга, шаперонами или же встраивается в мембрану [5; 8; 9].

Подробная структура этого РНК-белкового комплекса была получена спустя два десятилетия после того, как удалось получить первые кристаллы 50S субъединиц рибосомы в 1980 году *Bacillus stearothermophilus* [10]. Карта электронной плотности для большой субъединицы рибосомы была получена только в 1998 году [11], а полноатомная трехмерная модель обеих субчастиц бактериальной рибосомы была построена уже к 2000 году [4; 5; 12].

Большая субъединица рибосомы бактериальной клетки, имеющая коэффициент

седиментации 50S, состоит из двух рибосомных РНК (рРНК) с коэффициентами седиментации 5S и 23S, соответственно, а также, в случае *Escherichia coli*, 33 рибосомных белков. При этом 5S рРНК - белковый комплекс образует так называемый центральный протуберанец рибосомы, в то время как два других протуберанца — L1 и L7/L12 — образованы структурами 23S рРНК совместно с белками, от которых эти протуберанцы и получили свое название. Эукариотические рибосомы цитозоля также содержат 5S рРНК, формирующую центральный протуберанец, в то время как основная рРНК большой субъединицы увеличивается за счет т.н. сегментов разрастания (expansion segments, ES) и вариабельных регионов (variable regions, VR) до 26-28S, а также появляется 5,8S рРНК длиной в 154-156 нуклеотидов, гомологичная 5'-концевой последовательности 23S рРНК прокариот [13] (см. табл. 2.1).

В целом, дополнительные белки и белковые фрагменты в эукариотической рибосоме привели к тому, что массовое соотношение РНК:белок сместилось от 2:1 в бактериальной рибосоме к практически 1:1 в эукариотических. Еще сильнее этот тренд выражен в рибосомах митохондрий, правда, там он реализуется за счет сокращения рРНК и замещения ее белковыми структурами [14]. Размеры и доля рРНК в структуре рибосомы постепенно уменьшаются по мере восхождения вверх по эволюционной лестнице, достигая максимума у млекопитающих, где 36 из 82 рибосомных белков являются специфически митохондриальными (см. табл. 2.1). Замещение фрагментов рРНК белковыми структурами преимущественно на поверхности рибосомы, а также в рибосомном туннеле объясняется высокой специализацией митохондриальных рибосом: из 1-1,5 тыс. митохондриальных белков только порядка десятка закодировано в митохондриальной ДНК (8 у дрожжей, 13 у человека, рекордное число — более шести десятков, впрочем, встречаются и антирекордсмены вовсе без мтДНК [15]), и практически все они — ферменты дыхательной цепи, являющиеся мембранными белками. Рибосомы митохондрий также погружены во внутреннюю мембрану органеллы и выходящие из рибосомного туннеля белки параллельно с синтезом встраиваются в мембрану, в связи с чем митохондрии и нужен гидрофобный белковый слой, взаимодействующий как с гидрофобным окружением, так и с гидрофобной растущей пептидной цепью мембранных белков. При этом белковыми элементами замещаются некоторые функционально важные структуры рРНК, такие, как межсубъединичные мосты — области нековалентных контактов рибосомных субъединиц; это влияет на характер смещения субъединиц друг относительно друга в промежуточном состоянии транслокации [16].

Таблица 2.1. Состав рибосом различных доменов живых организмов. В разделе “состав рРНК” перечисляются все рРНК в рибосоме или субъединице с их коэффициентами седиментации и количеством нуклеотидов в скобках. ЦП тРНК – митохондриальная тРНК, формирующая центральный протуберанец. Источник таблицы – [16].

	Бактерии (<i>E. coli</i>)	Эукариоты (цитозоль)	Митохондрия млекопитающих	Митохондрия дрожжей
Вся рибосома				
Коэффициент седиментации	70S	80S	55S	74S
Молекулярная масса	2,3 MDa	3,3-4,3 MDa	2,7 MDa	3-3,3 MDa
Количество рРНК	3	4	3	2
Количество белков	54	79–80	82	82
Большая субъединица				
Коэффициент седиментации	50S	60S	39S	54S
Состав рРНК	23S (2904 н.)	26S-28S (3396-5034 н.) 5.8S (156–158 н.)	16S (1569 н.)	21S (3296 н.)
Количество белков	5S (120 н.) 33	5S (120-121 н.) 46-47	ЦП тРНК (73-75 н.) 52	46
Малая субъединица				
Коэффициент седиментации	30S	40S	28S	37S
Состав рРНК	16S (1534 н.)	18S (1800-1870 н.)	12S (962 н.)	15S (1649 н.)
Количество белков	21	33	30	36

Отбор аминокислот согласно последовательности, зашифрованной в мРНК посредством генетического кода, и их соединение в полипептидную цепь рибосома осуществляет при помощи транспортных РНК (тРНК). Зрелые тРНК состоят из трех петель, одна из которых несет антикодон, и акцепторного стебля, к которому посредством ферментов аминоксил-тРНК-синтетаз прикрепляется аминокислота, соответствующая антикодону. Привитая остатком аминокислоты по 3'-О-атому А76 тРНК (aa-тРНК) связывается с элонгационным фактором Tu (EF-Tu), содержащим молекулу ГТФ. В виде такого тройного комплекса тРНК и доставляется в рибосому.

Работа рибосомы делится на несколько стадий: *инициация*, в ходе которой посредством инициаторных факторов собирается комплекс из двух субъединиц рибосомы, мРНК и (в случае бактериальных рибосом) fMet-P-тРНК^{fMet}, *элонгация*, на каждом цикле которой происходит присоединение одной аминокислоты, и

терминация трансляции с высвобождением пептидной цепи посредством белковых релизинг-факторов, имитирующих тРНК.

В ходе одного цикла элонгации — удлинения синтезируемой рибосомой пептидной цепи на одну аминокислоту — тРНК сменяет несколько положений рибосомы, которые обозначаются как А, Р или Е-сайты, причем таковые сайты имеются как на малой, так и на большой субъединице (рис. 2.1, **В**). Тройной комплекс с аа-тРНК размещается так, что антикодонная петля тРНК оказывается в А-сайте малой субъединицы, в так называемом декодирующем центре (ДЦ). При этом белок EF-Tu (или содержащий гомологичный домен eEF1 у эукариот) связывается преимущественно с протуберанцем L7/L12, который содержит так называемый центр связывания ГТФаз (GTPase associated center, GAC). Для тРНК такое положение именуется гибридным А/Т-сайтом связывания, поскольку он занимает различные по обозначению сайты на малой и большой субъединицах. Занятие А/Т-сайта в случае соответствия антикодона кодону сменяется аккомодацией с расщеплением ГТФ и диссоциацией EF-Tu от тРНК и ГТД от EF-Tu, которая, в случае полного соответствия кодона и антикодона, завершается размещением акцепторного стебля (или, если точнее, ССА-конца) в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ). Вслед за этим происходит пептидилтрансферазная реакция (ПТР), соединяющая концевую аминогруппу аминокислотного остатка с аа-А-тРНК и карбоксильный углерод С-конца пептидной цепи, что до реакции ацилировала Р-тРНК. Далее, пептидил-тРНК необходимо переместиться из А-сайта в Р-, а деацилированной тРНК — в Е-сайт на выход из рибосомы. Это происходит в процессе транслокации, который может протекать спонтанно, но для обеспечения скорости, достаточной для выживания клетки, необходим ГТФ-зависимый элонгационный фактор (EF-G у прокариот, eEF2 у эукариот и aEF2 у архей). Этот фактор катализирует перемещение тРНК из гибридных состояний, т. н. А/Р- и Р/Е-сайтов, куда они смещаются спонтанно, в канонические Р/Р- и Е/Е-сайты (рис. 2.1, **А**).

Все сайты связывания тРНК, равно как и функциональные центры, ПТЦ и ДЦ, образованы остатками рРНК. Впрочем, в порядке исключения рибосомные белки присутствуют в активных центрах. Так, например, белок S12 простирается в область ДЦ и участвует в распознавании геометрии кодон-антикодонной пары [18]. Также рибосомные белки могут быть ответственны за измененное положение тРНК в эукариотической рибосоме относительно такового в бактериальной [19].

В структуре бактериальных 23S и 16S рРНК, а также их гомологов в рибосомах

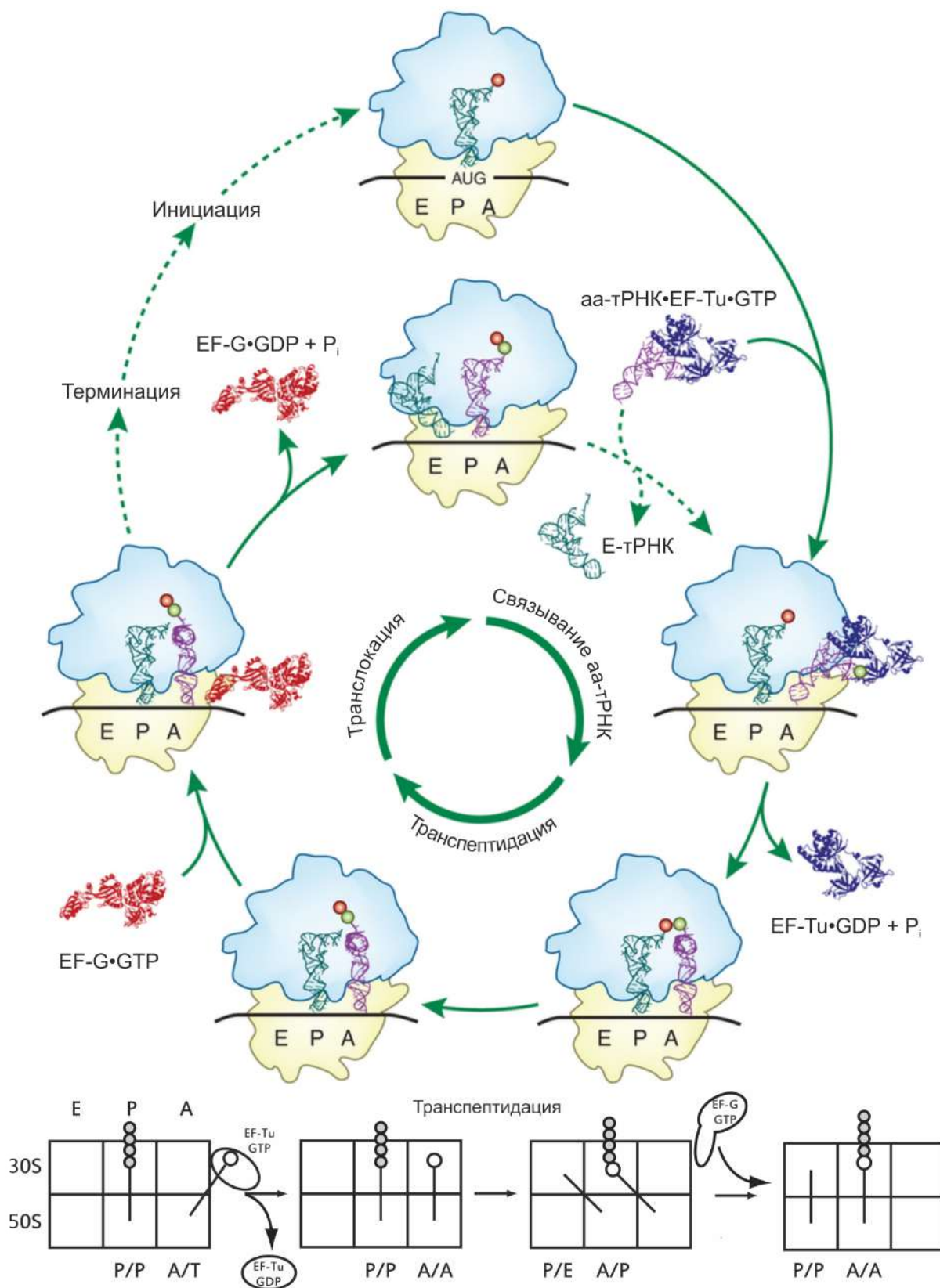


Рис. 2.1. Элонгационный цикл рибосомы. **А.** Основные этапы элонгации **В.** Основные сайты, занимаемые тРНК. Здесь кружочки обозначают аминокислотные остатки, прикрепленные к тРНК [17].

позднее появившихся организмов, принято выделять домены рРНК, 6 доменов в

основной рРНК большой субъединицы и 4 домена — в рРНК малой субъединицы. Образующая малую субъединицу 16S рРНК также состоит из четырех доменов, и эти домены полностью соответствуют макроскопическим доменам в самой субъединице: тело малой субъединицы формируется 5'- и 3'-минорным доменами, ее голова — 3'-мажорным доменом, а платформа образуется из центрального домена.

Напротив, домены третичной структуры 23S рРНК плотно переплетены друг с другом в трехмерном пространстве, образуя единое тело большой субъединицы вокруг функционального ядра — ПТЦ (см. рис. 2.2, заимствованный из [12]).

В дальнейших главах обзора мы сосредоточились на систематизации структурно-биоинформатических данных о рибосоме, которые могли бы быть полезными для понимания ее функции и регуляции, в том числе в свете эволюционной вариабельности этого макромолекулярного комплекса. Такой структурно ориентированный подход к рассмотрению рибосомы полностью соответствует методам и сути настоящего исследования.

2.1.2 Вторичная и третичная структура рРНК

Третичная структура рРНК, определяющая очертания субъединиц рибосомы, поддерживается несколькими типами взаимодействий.

Первый из них — это т.н. “магниевые мостики”, в которых ионы Mg^{2+} содержат в своей координационной сфере от двух фосфатных групп нуклеотидов рРНК. Иногда такие ионы магния организованы в группы по два-три атома. Концентрация структурообразующих ионов магния, координирующих нуклеотиды, достигает максимума в универсально консервативном регионе вокруг ПТЦ. Также они обнаружены на поверхности взаимодействия рРНК и рибосомных белков [20].

Следующий структурообразующий тип взаимодействий в рибосоме — это третичные взаимодействия самих рРНК, или водородные связи, сформированные остатками из разных элементов вторичной структуры (спиралей или межспиральных участков). Помимо простого коаксиального стэкинг-взаимодействия двух и более спиралей, часто в третичных контактах элемент одной вторичной структуры удерживается в малой борозде спирали РНК другой структуры посредством водородных связей. Таким образом, как правило, упаковываются друг ко другу спирали рРНК, входя в малые бороздки спирали-контрагента азотистыми основаниями со стороны своей малой борозды или же гребнем фосфатов [21].

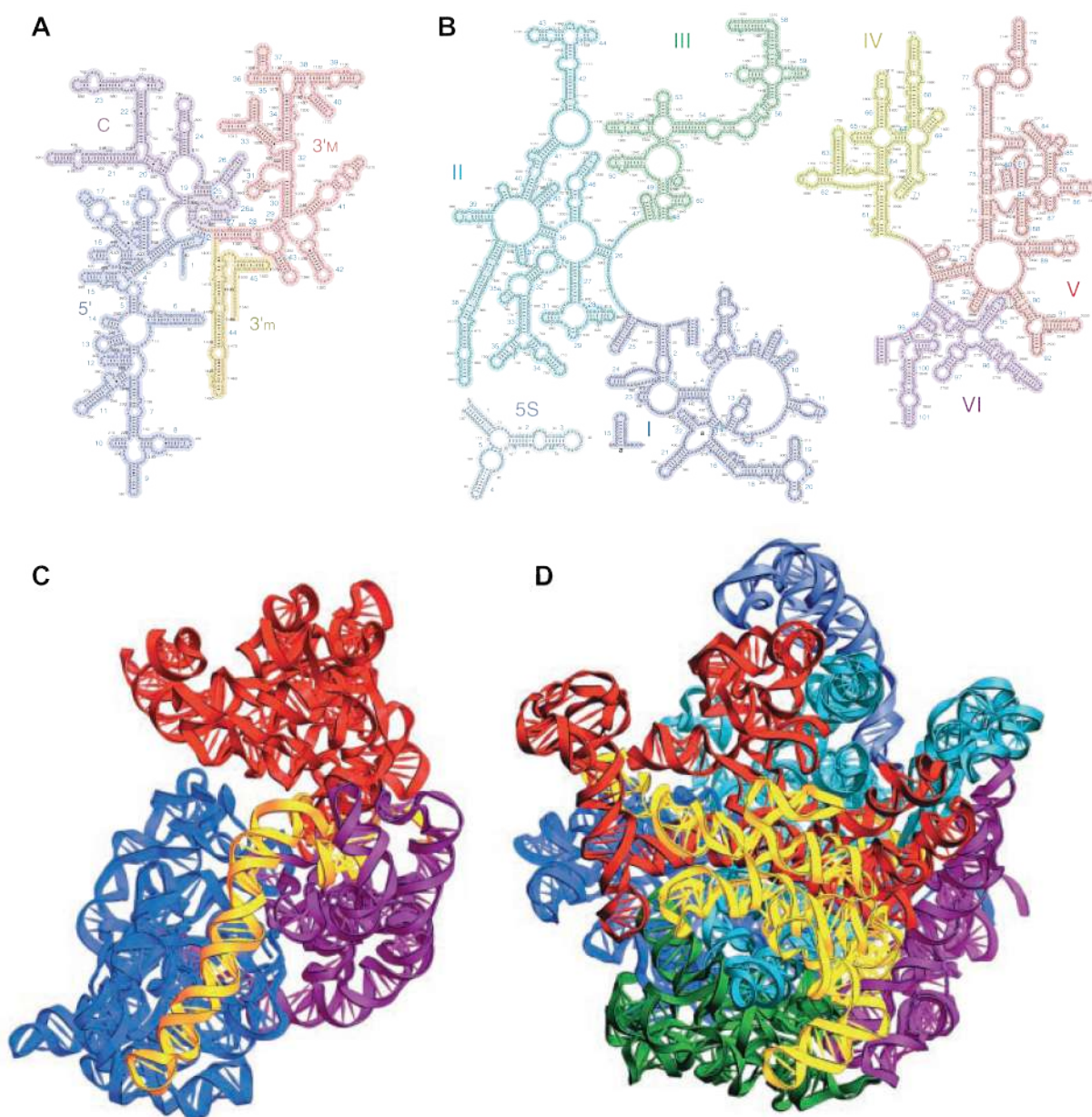


Рис. 2.2. Вторичная и третичная организация доменов 16S и 23S рРНК бактериальной рибосомы. **А.** Домены 16S rRNA *T. thermophilus*, отображенные на схеме вторичной структуры различными цветами **В.** Домены 23S rRNA *T. thermophilus*, отображенные на схеме вторичной структуры различными цветами **С.** Пространственная укладка 16S рРНК, с тем же цветовым обозначением доменов, что и на (А)-схеме. **Д.** Пространственная укладка 23S рРНК, с тем же цветовым обозначением доменов, что и на (В)-схеме. В отличие от 16S рРНК, домены 23S рРНК сильно переплетены между собой в пространстве и не формируют доменов большой субъединицы рибосомы, подобно тому, как это происходит в 16S рРНК [12].

Более интересным случаем является взаимодействие неспаренных остатков со спиральными структурами. Самым распространенным взаимодействием такого типа является встраивание не задействованного в парных взаимодействиях аденозина в малую бороздку двойной спирали РНК, иначе именуемого А-минорным мотивом, или взаимодействием (от minor groove — малая бороздка) (рис. 2.3,

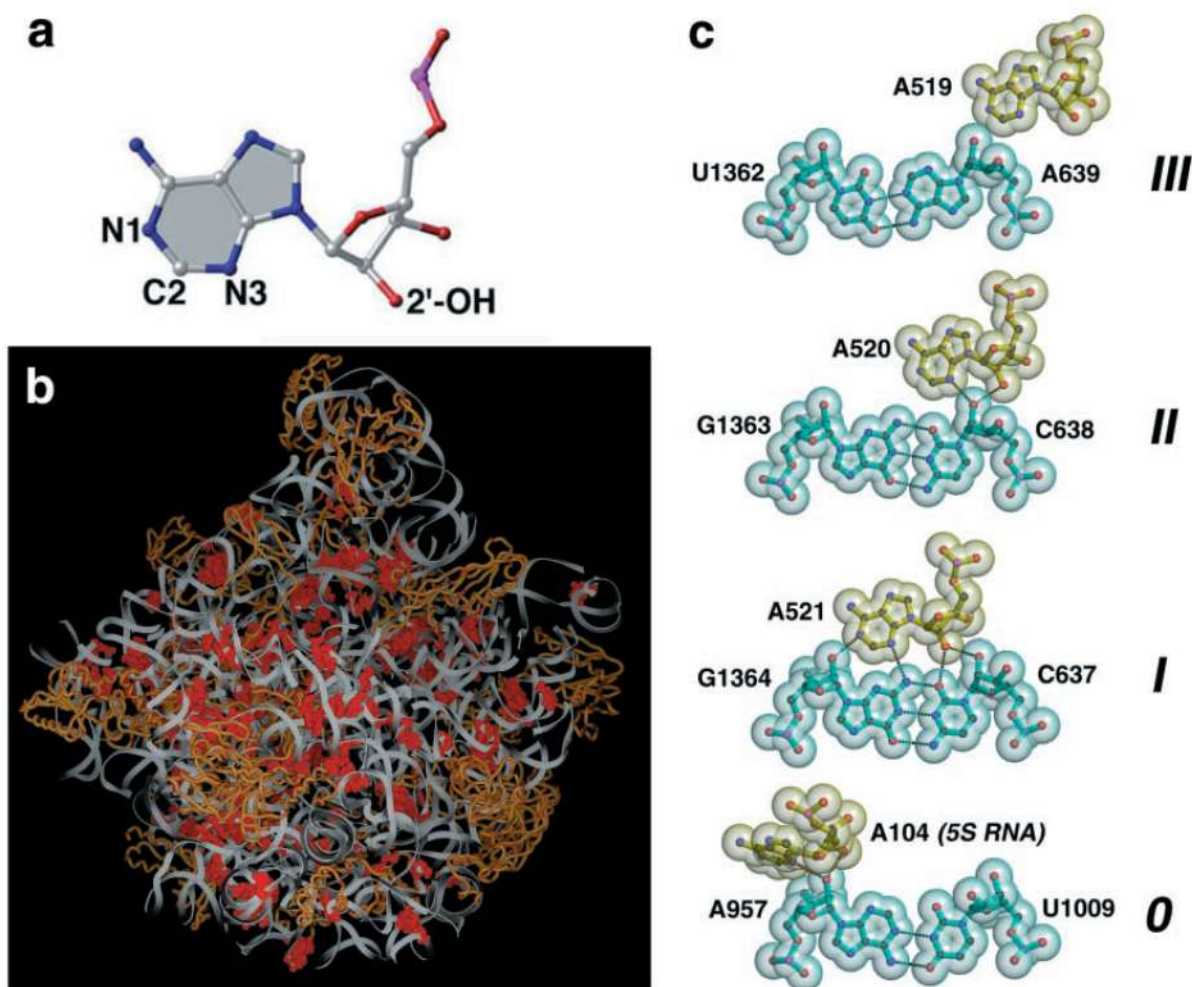


Рис. 2.3. а. Молекула аденозин-5'-монофосфата и его N1, N3, и 2'-ОН атомы, формирующие водородные связи в малой бороздке РНК-спирали при образовании А-минорного взаимодействия с ней. б. Структура 50S субчастицы рибосомы *H. marismortui*, где красными шарами показаны все 186 аденозинов, формирующих А-минорные взаимодействия с двойными спиральями РНК. в. Типы А-минорных взаимодействий, обнаруженных в 50S субчастице рибосомы *H. marismortui*. Тип взаимодействия определяется положением 2'-ОН группы аденозина относительно двух 2'-ОН пары нуклеотидов-рецепторов взаимодействия. Типы I и II характерны только для аденозина, в то время как тип 0 и тип III могут быть образованы и другими нуклеотидами, хотя А встречается чаще всего [12].

А и С). Этот мотив встречается во множестве по всей рибосоме (рис. 2.3, В), зачастую образуя последовательность из нескольких взаимодействий с подряд идущими парами спиралей рРНК, или просто кластеризуются в определенных участках третичной структуры. А-минорные мотивы являются частью критически важных чувствительных взаимодействий, таких, комплекса пары кодон-антикодон в декодирующем центре или связывания ССА-концов тРНК в А- и Р-сайтах ПТЦ [22; 23].

Интересный мотив, обнаруженный в том числе и в функциональных центрах рибосомы, ответственных за декодирование и транслокацию, соединяет две спирали

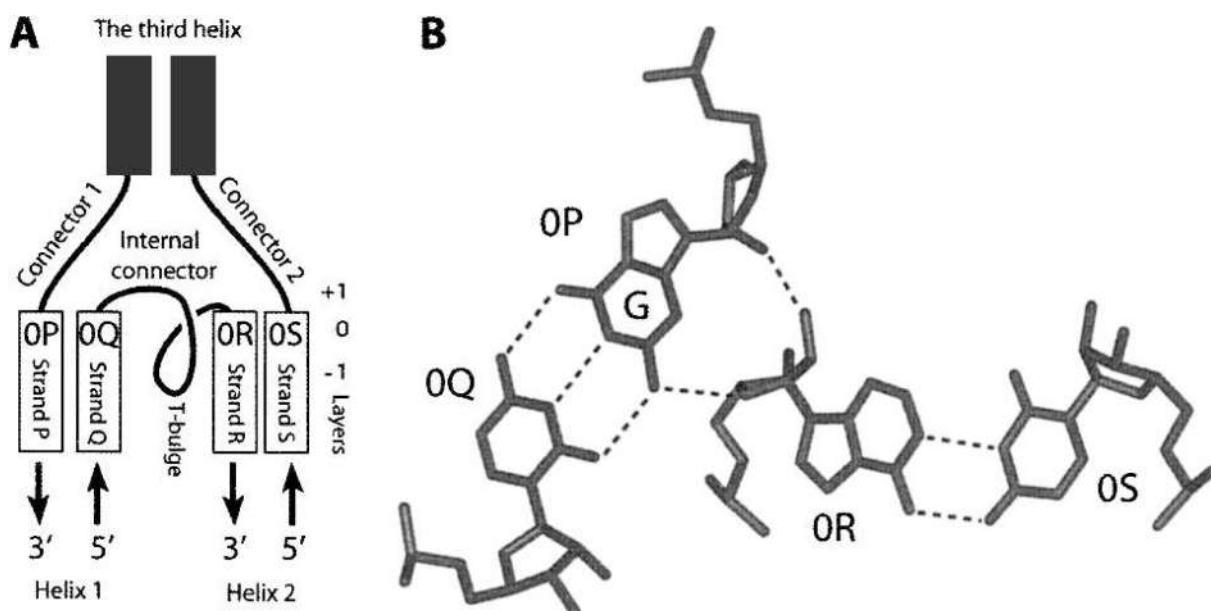


Рис. 2.4. А. Общая схема т.н. “G-ribo”-мотива. Прямоугольниками обозначены области двойных спиралей РНК, кривыми – неспаренные регионы. Спираль 1 состоит из линий Р и Q, а спираль 2 — из линий R и S. Конечные пары нуклеотидов [OP;OQ] и [OR;OS] из спиралей 1 и 2, соответственно, обозначены на рисунке. Положение слоев -1, 0, и +1 относительно слоя этих оснований также отображено справа. В. Взаимное расположение пар [OP;OQ] и [OR;OS]. Пунктиром обозначены водородные связи. Как видно из их расположения, G в позиции OP обязателен для такого взаимодействия [24].

под острым углом посредством двух неспаренных участков, был назван “G-ribo”, поскольку узловое соединение образовывалось за счет водородных связей гуанина одной спирали с сахарофосфатным остовом нуклеотидного остатка другой спирали [24] (рис. 2.4).

И наконец, еще один тип взаимодействий, поддерживающий пространственную структуру рРНК — это их нековалентные связи с рибосомными белками. Большинство рибосомных белков, за редким исключением, находятся преимущественно в поверхностных слоях рибосомы, проникая вглубь упаковки РНК в основном длинными неструктурированными фрагментами [25; 26].

Тем не менее, белки распознают определенные третичные мотивы в структуре рРНК. Таковыми являются, прежде всего различные тетралупы [27], а также К-повороты (K-turns или kink-turns), обнаруженные в рРНК в количестве двух штук в 30S субъединице *H. marismortui* и шести — в 50S [28]. Последний упомянутый мотив представляет из себя внедренную в двойную спираль асимметричную петлю с А-минорным взаимодействием между элементами. К-поворот разворачивает спираль примерно на 60 градусов (рис. 2.5).

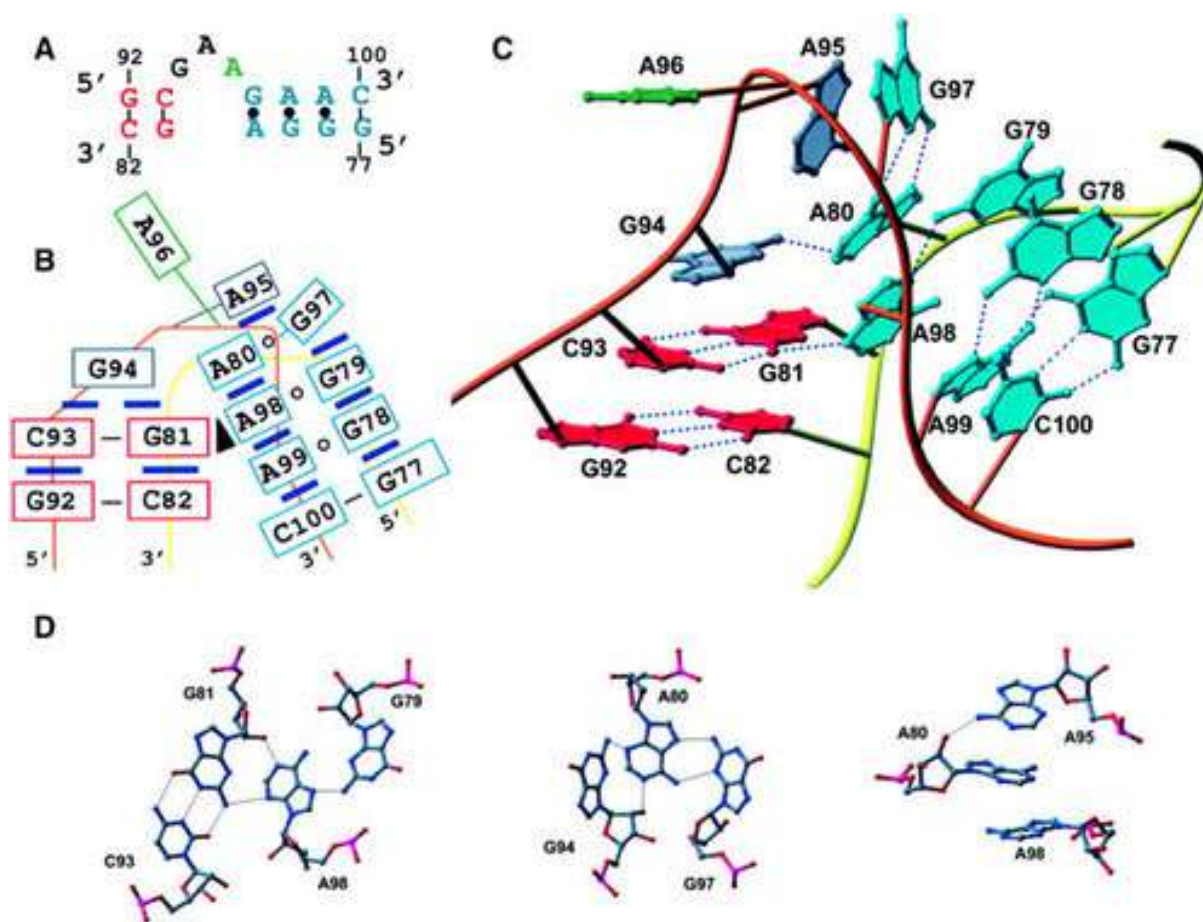


Рис. 2.5. Структура К-поворота на примере КТ-7. **А.** Вторичная структура мотива. Двухжелевые участки выделены красным и голубым. Выпетливающийся аденин показан зеленым. **В.** Схематичное представление пар оснований и стэкинг-взаимодействий в К-повороте. Черным треугольником отмечено А-минорное взаимодействие. **С.** Трехмерное изображение КТ-7. Пунктиром обозначены водородные связи. **Д** Отдельные взаимодействия нуклеотидных остатков [28].

2.1.3 Минимальная рибосома

Сложная организация рибосомы, рассмотренная в предыдущей главе, закономерно вызывает вопрос о ее функциональной необходимости или же избыточности, причем как для всей рибосомы, так и для каждого активного центра по отдельности. Насколько же велика может быть т.н. “минимальная рибосома” или минимальный декодирующий либо пептидилтрансферазные центры?

Аналитический разбор нуклеопротеинового комплекса логически начинается с определения функции встроенных в него белков. Рибосомные белки, как правило, заполняют пустоты, образующиеся при укладке рРНК в третичной структуре, располагаясь преимущественно на поверхности рибосомы, при этом практически не заходя в области взаимодействия субъединиц, сайты связывания тРНК или функциональные центры.

Таблица 2.2. Белки прокариотической рибосомы, делеция которых не приводит к потере функциональности рибосомы. Прочерк означает отсутствие эффекта делеции, **ts** — восприимчивость к повышению температуры у клеток с делецией по данному белку, **cs** — повышенную чувствительность к холоду [31].

Делеция	Мутант	Фенотип
L1	RD19, MV17-10	—
L11	AM68, AM76, AM77	—
L15	AM16–98	cs
L19	AM149	—
L24	AM290	ts
L27	AM125	cs
L28	AM81, AM108	cs
L29	AM111	—
L30	AM10	—
L33	AM90, AM108	cs
S1	VTS03	—
S6	AM80	— (неопубл.)
S9	AM83	cs
S13	AM109–113	— (неопубл.)
S17	AM111	ts
S20	VT514	ts

Большинство белков не являются критически важными для функционирования рибосомы [29; 30]. Примерно треть белковых молекул может быть удалена из рибосомы поодиночке, не вызывая заметного нарушения в функционировании клеток, провоцируя в ряде случаев лишь чувствительность к высокой или низкой температуре (табл. 2.2).

Известно, что сама по себе большая субъединица способна образовывать пептидную связь между произвольными аминокислотами, причем для этого ей не нужна ни 5S рРНК, ни ряд белков [32; 33]. Даже обработка большой субъединицы протеиназой К не привела к утрате ее каталитической активности [34]. Это неудивительно, ведь функциональное “ядро” большой субъединицы рибосомы, считающееся наиболее древней ее частью — ближайшая окрестность ПТЦ — полностью состоит из остатков РНК, а фрагменты рибосомных белков появляются только на расстоянии 17 и более Å от ПТЦ бактериальной рибосомы [35].

Правда, обработка 50S субъединицы протеиназой К не удалила полностью ее белковую составляющую, оставив примерно 5% в виде внедренных в РНК фрагментов. Дальнейшие попытки получить минимальное пептидилтрансферазное ядро усечением структуры 23S рРНК не увенчались успехом: произведенные *in vitro* селекцией из центральной части V домена 23S рРНК фрагменты если и способствовали конъюгации аминокислот, то продукты такого синтеза не содержали пептидных

связей [36]. Напротив, эксперименты по созданию РНК-пептидилтрансфераз *de novo* оказались довольно успешны, причем полученные рибозимы в активном центре содержали области с существенной степенью сходства последовательностей с ПТЦ [37–39]. Впрочем, субстраты этих рибозимов существенно отличались от тех, что взаимодействуют с рибосомой.

Еще один подход к выделению функционального ПТЦ-ядра — это разделение 23S рРНК на самостоятельные элементы третичной структуры. Одной из подсказок на этом пути служит расположение участников А-минорных взаимодействий в 23S рРНК: двойные спирали, связывающие выпетливающийся аденин, концентрируются в области V домена 23S рРНК, формирующей консервативную область вокруг ПТЦ. Очевидно, что фрагмент рРНК, содержащий двойную спираль, иерархически старше фрагмента, выделяющего аденин для встраивания в его малую борозду, и второй элемент может быть удален без нарушения структуры первого. Опираясь на эту логику в анализе А-минорных и других типов взаимодействий, авторам работы [40] удалось выделить в 23S рРНК 12 структурных слоев вокруг ПТЦ-ядра (занимающего примерно 7% всей рРНК), которые могут быть поочередно удалены из третичной структуры (рис. 2.6).

Оставшийся фрагмент, содержащий несколько спиралей V домена и обеспечивающий связывание 3'-ССА-концов А- и Р-тРНК, также может быть разделен на два симметричных региона с гомологичными последовательностями и структурами [41]. Один из этих фрагментов связывает ССА-конец аа-А-тРНК, и второй, связывающий 3'-фрагмент пептидил-Р-тРНК, расположены осесимметрично друг относительно друга (рис. 2.7). Такой минимальный фрагмент, предположительно, является остатком гипотетической “проторибосомы”, осуществлявшей неизбирательный пептидный синтез.

Белковый состав малой субъединицы также может быть существенно усечен с сохранением активности ДЦ: связывание антибиотика касугамицина приводит к появлению 61S частиц, содержащих нераздельные большую и малую субъединицы, в которой последняя лишена шести белков (включая участвующий в декодировании S12) и еще 5 белков присутствовали в ограниченных количествах [31; 42]. Такие 61S частицы поддерживали трансляцию мРНК без иницирующей последовательности, демонстрируя таким образом упрощенный функционал, который мог существовать на более ранних этапах развития жизни.

Митохондриальные рибосомы содержат существенно меньшие рРНК, нежели

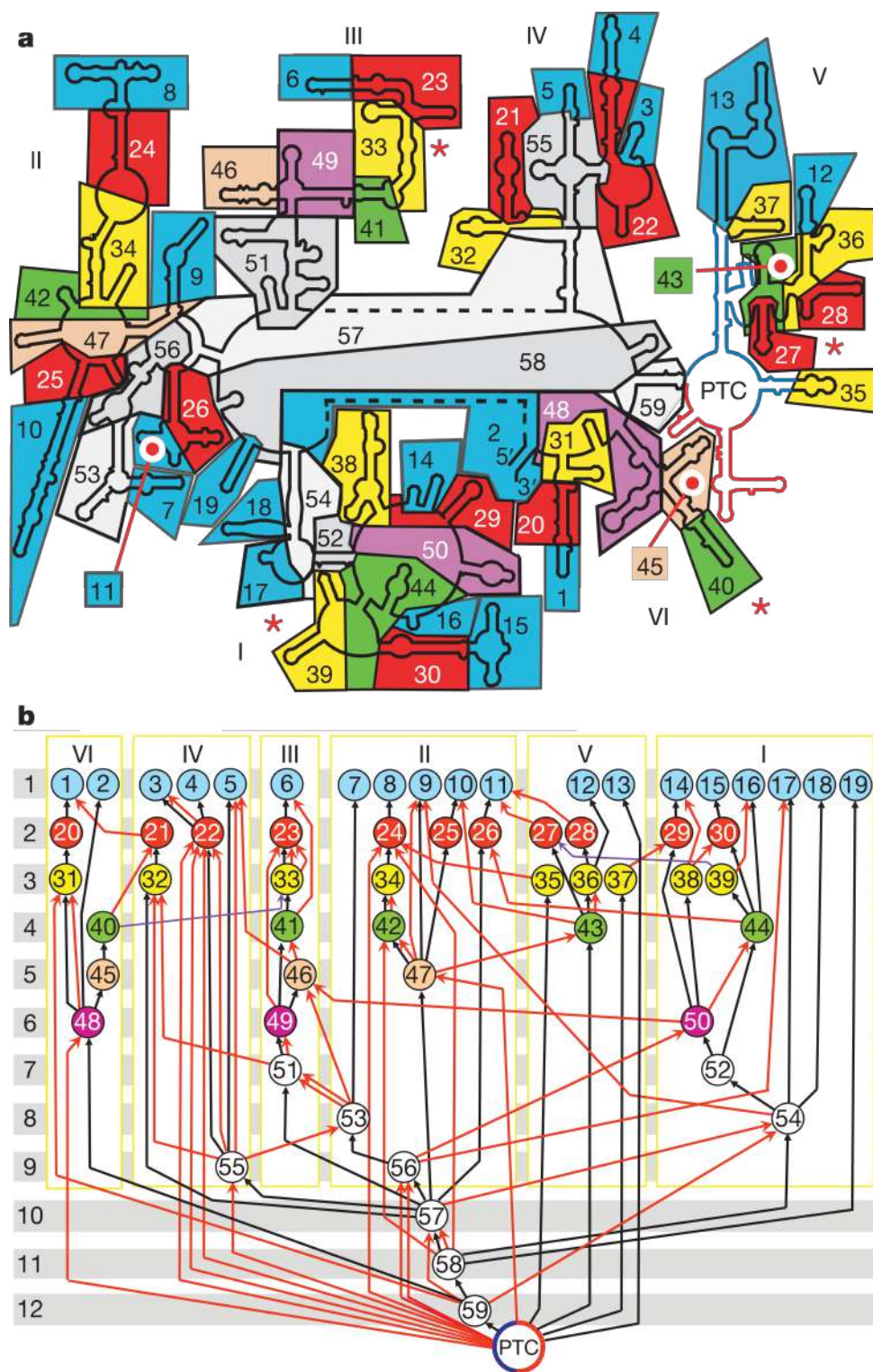


Рис. 2.6. Элементы вторичной структуры 23S рРНК *E. coli* (а) и сеть взаимодействий между ними (б). Цвета элементов в а и в б совпадают. а. Область ПТЦ разделена цветом на симметричные регионы т. н. “проторибосомы”: голубым обозначен фрагмент, содержащий Р-петлю и красным — фрагмент с А-петлями. б. Иерархия структурных элементов 23S рРНК. Стрелка от элемента Q к элементу Р означает зависимость структуры Р от наличия элемента Q. Красная стрелка обозначает А-минорное взаимодействие, соединяющее элементы, а фиолетовая — нелокальные псевдоузлы [40].

все прочие, из-за замещения ее элементов белком на периферии комплекса. Так, консервативное ядро, вычисленное без учета рибосом органелл эукариотических

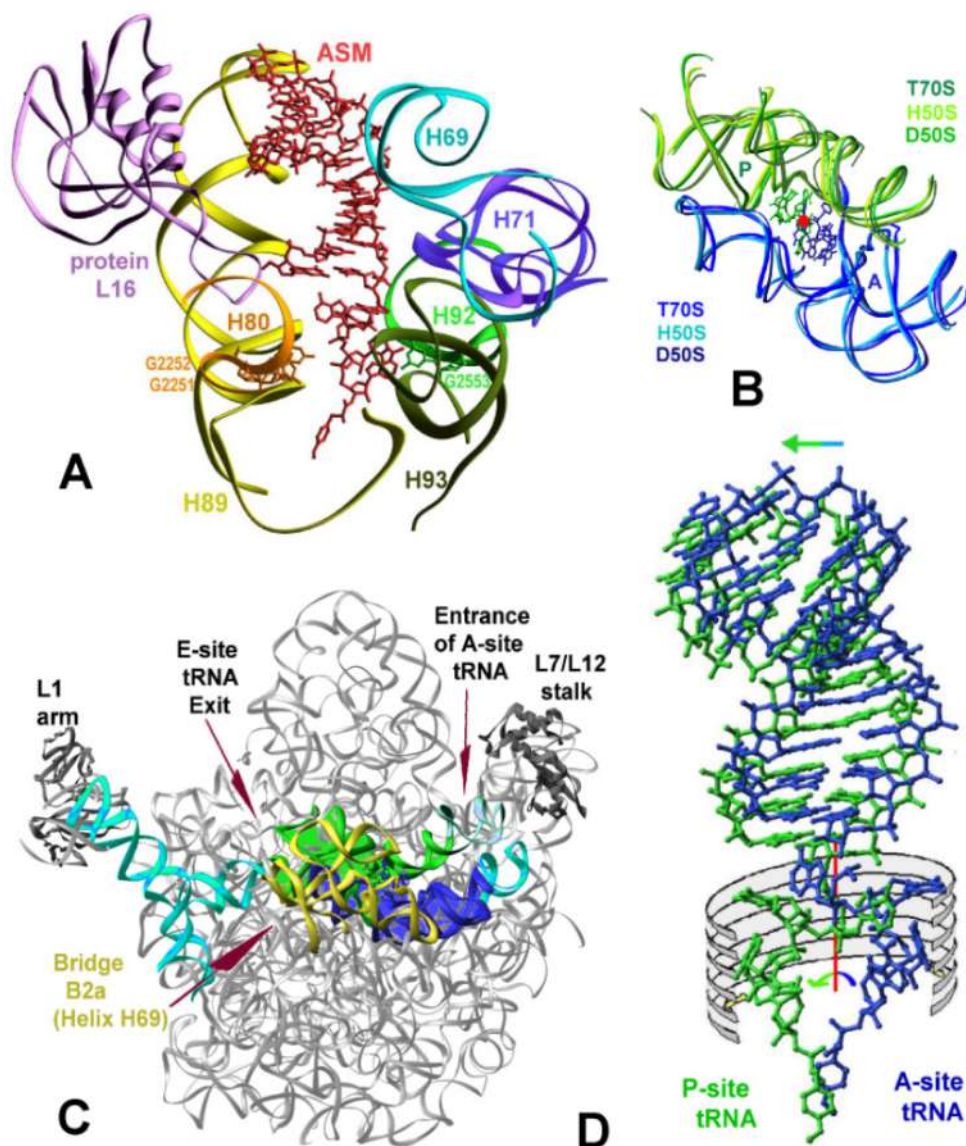


Рис. 2.7. ПТЦ и симметричный регион 23S рРНК. **А.** Углубление, содержащее ПТЦ-карман, включая ASM, 35-нуклеотидный аналог субстрата А-сайта с aa-ССА-концом и акцепторным стеблем тРНК (обозначен красным). **В–D** Здесь половина симметричной области, содержащая А-петлю и А-тРНК отображается синим, а содержащая Р-петлю — зеленым. Ось симметрии показана красным. **В.** Наложение сахарофосфатных остовов симметричных регионов в 70S *T. thermophilus* (PDB 1GIY), больших субъединицах 50S *D. radiodurans* (PDB 1NKW) и 50S *H. marismortui* (PDB 1JJ2). **С.** Симметричный регион в большой субъединице рибосомы (PDB 1NJP). рРНК отображена серым цветом, и лишь непосредственные продолжения симметричного региона — голубым. Особо отмечены позиции входа и выхода молекул тРНК. Золотистым цветом выделен межсубъединичный мост B2a, соединяющий активные центры обеих субъединиц рибосомы (ПТЦ и ДЦ). **Д.** Схематичное изображение комбинированного линейного и вращательного смещения, которые тРНК совершает по мере продвижения из А-сайта в Р-сайт. Очертания внешней поверхности ПТЦ изображены светло-серыми лентами, ось симметрии — красным. Наложение 2-х молекул тРНК друг на друга, изображенное здесь, происходит в результате вращения одной из них вокруг оси как целого [41].

клеток, существенно сжимается до ближайшего окружения активных центров, если рассматривать также и последовательности митохондриальных рРНК. В рибосоме с одной из самых коротких известных последовательностей рРНК —

митохондриальной рибосоме *Caenorhabditis elegans* — сохраняется только около половины универсально консервативных (без учета органелл) остатков РНК. Особенно ярко это проявилось для большой субъединицы, в которой только 5% остатков оказалось консервативными во всех типах рибосом (рис. 2.8). Неизменными оказались части IV и V доменов, образующих щель ПТЦ, а также SRL и некоторые области межсубъединичных контактов. Из межсубъединичных мостов при принятии во внимание митохондриальных рибосом универсально консервативными остаются лишь несколько: В2а, В2с, В3 и В7b [43]. Разумеется, это не означает, что сохранившиеся консервативные элементы рРНК — единственные необходимые рибосоме для ее функционирования, это лишь показывает, что центральные части рибосомы не оказалось возможным заменить белком, и что в этой области требуются уникальные свойства именно РНК.

2.2 Аллостерические явления в рибосоме

2.2.1 Понятие аллостерии в биологических макромолекулах

Представления об аллостерии возникли при изучении регуляции активности белковых ферментов связыванием низкомолекулярного лиганда [44]. Этот термин произошел от греческого “αλλος”, что означает “другой”. В связи с открытием функциональных РНК и изучением механизма их действия, стало понятно, что аллостерия не является уникальным свойством энзимов, а является основой регуляторных настроек практически всех биополимеров на разных уровнях организации; аллостерия — это, по сути, способность биополимеров и молекулярных комплексов воспринимать, распространять и хранить определенное время информацию, зафиксированную в конформационном состоянии остатков белковой или нуклеиновой цепи. Это свойство проявляет себя не только в регуляции ферментов и других функциональных белков [45], но и в регуляции экспрессии генов [46; 47], взаимодействия лиганда с рецептором, активности ионных каналов [48], и этот список можно продолжать. Проявлять аллостерические свойства, помимо белков, могут комплексы ДНК с белком [49; 50], а также РНК различных размеров: от коротких аптамеров [51] до предмета нашего исследования — рибосомы.

Возможность аллостерии определяется двумя свойствами биополимеров: с одной стороны, их конформационной гибкостью и вариабельностью, с другой, достаточно

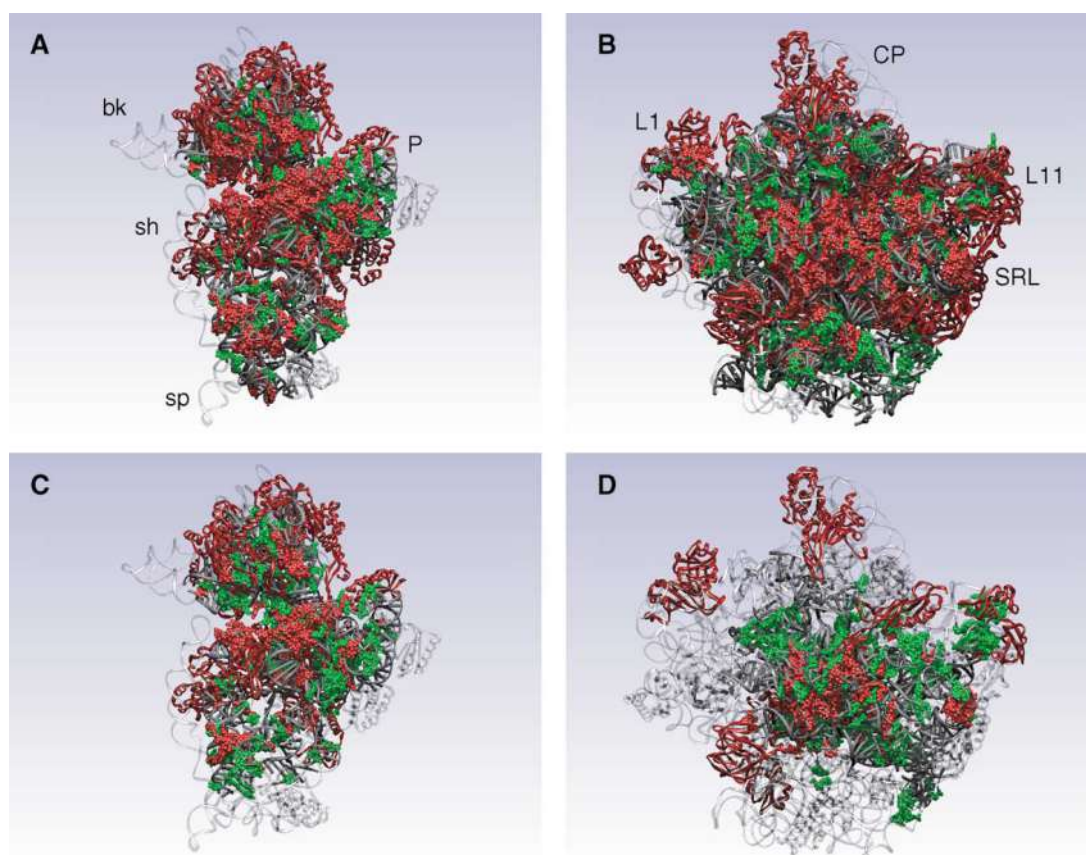


Рис. 2.8. Консервативные участки рибосомы по данным цитоплазматических рибосом всех трех филогенетических доменов ((**a**) и (**b**)) и по тем же данным плюс рибосомы митохондрий и хлоропластов ((**c**) и (**d**)), для малой ((**a**) и (**c**)) и большой ((**b**) и (**d**)) субъединиц. Красными сферами обозначены области, консервативные не менее чем на 99%, зелеными — консервативные на 90%, темно-серым показаны спирали рРНК, чье положение консервативно, но которые обладают менее чем 90%-ой консервативностью на нуклеотидном уровне, светло-серым — прочие участки рРНК. Консервативные белки также показаны красным, а не-консервативные — серым. Расшифровка сокращений на рисунке: *bk* — “клюв” 30S субъединицы; *sh* — плечо; *sp* — подошва; *P* — платформа; *L1* — L1-протуберанец 50S субъединицы; *CP* — центральный протуберанец; *L11* — L11-протуберанец; *SRL* — сарцин-рициновая петля [43].

плотной взаимосвязанностью их остатков. Сочетание этих свойств позволяет существовать нескольким конформационным состояниям одной биомолекулы вблизи глобального минимума свободной энергии, а переходы между ними и обеспечивают распространение аллостерического сигнала по всей макромолекуле. В исторически первой модели, выросшей из исследования гемоглобина, было принято рассматривать два состояния молекулы: R (от “relaxed”, т. е. релаксированный) и T (“tense”, напряженный). Если белок свободен, т. е. не связал лиганд, то между этими состояниями существует термодинамическое равновесие, которое может быть смещено к одному из состояний связыванием лиганда, т. к. его сродство к различным состояниям кардинально отличается. Такими аллостерическими эффекторами могут быть как низкомолекулярные лиганды, так и различные

мутации, встраивание неканонических остатков, или даже рН и ионная сила раствора. Чтобы аллостерическая регуляция активного центра была возможной, конформация активного центра должна значимо различаться в R и T состояниях, так, что одно из них должно быть активным, а другое — инактивированным; тогда связывание аллостерического лиганда может регулировать функциональную активность биомолекулы [52].

Количественные математические модели, описывающие аллостерическую регуляцию, также совершенствовались со временем, позволяя объяснять все большее число феноменов. Первая из них, названная согласованной ("concerted model"), или MWC по первым буквам фамилий ее создателей (Monod-Wyman-Changeux) [53] предполагает, что биомолекула переходит из одного конформационного состояния в другое целиком, и все ее субъединицы (или другие структурные элементы) одновременно могут занимать одинаковые состояния, будь то активное или неактивное. Таким образом, переключение целой молекулы абсолютно согласованно, что определило и название модели.

Последовавшая за ней последовательная модель ("sequential model"), также имеющая аббревиатуру KNF в честь авторов (Koshland-Némethy-Filmer) [54], уже включает в себя возможность неодинаковых одновременных состояний субъединиц белка, но при этом изменение состояния одной смещает равновесие для каждой из следующих субъединиц. Это допущение расширяет возможности модели, и она уже способна количественно описывать как положительную, так и отрицательную кооперативность (т. е. снижение сродства к лиганду по мере заполнения сайтов связывания биомолекулы). Характерный пример последнего типа кооперативности — регуляция аденозинтрифосфатазы многосубъединичного шаперона бактерий GroEL [55].

Еще один пример усовершенствования математического описания кооперативности сайтов связывания лигандов — т. н. термодинамическая ансамблевая аллостерическая модель (ensemble allosteric model, EAM) [56], дающая возможность описать ряд сложных явлений в аллостерии, например, перемену знака воздействия лиганда при смене внешних условий. Примеры такого явления встречаются у некоторых факторов транскрипции, переключающих свою роль от агонистов до антагонистов под действием внешних факторов [57; 58]. В этой модели разница в свободной энергии между состояниями состоит как из разницы энергий состояний отдельных доменов, так и различия в энергии взаимодействия между доменами, которая

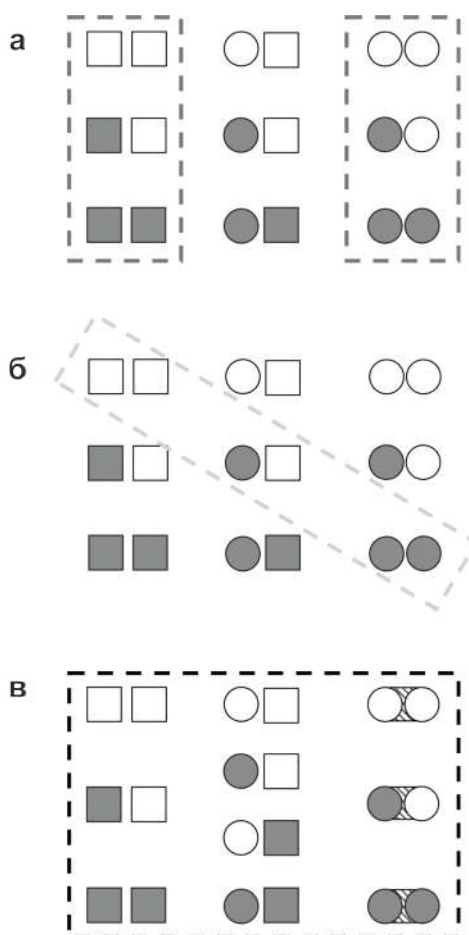


Рис. 2.9. Схематичное представление моделей аллостерии и тех состояний, которые они принимают во внимание. В данном представлении кругами обозначены релаксированное, а квадратом — напряженное состояние; при этом закрашенная фигура — это домен, связавший лиганд, а незакрашенная — свободный домен. Пунктирные фигуры при этом объединяют все те состояния, что модель принимает во внимание и способна описать. **А.** MWC-модель. **В.** KNF-модель. **С.** EAM-модель (модель энергетических ансамблей) [56].

также подвержена изменению при аллостерических переходах. Наглядно развитие возможностей термодинамических моделей в их способности описывать все большее количество состояний молекул представлено на рис. 2.9.

Однако, подобный тип моделей принимает во внимание лишь условно названный “четвертичным” уровнем взаимодействий белка, т. е. уровень взаимодействия отдельных субъединиц. При этом «третичный» уровень, т. е. уровень отдельных нековалентных взаимодействий и конформаций остатков биомолекулы, представляет собой в значительной мере т.н. “черный ящик”. Однако, третичные взаимодействия могут и сами обеспечивать аллостерические явления в односубъединичных белках, что и делает аллостерию универсальным свойством, присущим всем белкам, кроме фибриллярных [59]. Иначе говоря, первый тип моделей был сформирован из термодинамического подхода к описанию аллостерии, однако, для ее представления

требуется также и структурный подход, который описывал бы передачу сигналов как релаксацию полученной энергии чередой изменений определенных связей на определенном аллостерическом пути (pathway) или сети (network) взаимодействий [60].

Во многих белковых молекулах пути и сети распространения аллостерических сигналов были предсказаны как с помощью современных вычислительных методов [61], так и ЯМР-спектроскопии [62]. Такие исследования часто выявляют множество альтернативных аллостерических путей, объединенных в сложную глобальную сеть взаимодействий (англ. global communication networks, или GCN), включающую в себя как третичные, так и четвертичные связи, и, таким образом, соединяющую всю молекулу в единое целое [63].

Различия между аллостерическими состояниями могут быть не только в положении конкретных атомов остатков биомолекулы, но и в амплитуде как колебательных, так и вращательных мод. Иначе говоря, конформационные состояния могут отличаться не только энтальпийным членом свободной энергии (т. е. изменением равновесного положения атомов и остатков), но и ее энтропийным членом [64]. Теоретическое предсказание возможности подобной «аллостерии без конформационных изменений» было сделано еще 1984 г. [65] Позже это явление обнаружилось в ряде примеров. Оценка амплитуд колебаний основных мод, рассчитанная на основании B-факторов структурных данных избыточной выборки белков как с лигандами, так и в свободном состоянии, выявила существенную разницу в энтропийной составляющей при связывании лигандов примерно у половины проанализированных структур [66].

Таким образом, аллостерические взаимодействия являются фундаментальным свойством практически подавляющего большинства биомолекул. В изучении их выделяют два основных подхода: термодинамический и структурный. С точки зрения первого, у биомолекулы есть несколько состояний около глобального минимума свободной энергии, и связывания лиганда смещает равновесие между ними. С точки зрения второго, воздействие лиганда передается по сети внутренних взаимодействий биомолекулы, меняя конформацию и подвижность ее составляющих.

2.2.2 Аллостерическая регуляция связывания тРНК различными сайтами рибосомы

2.2.2.1 А-сайт рибосомы

Как уже отмечалось, зрелая тРНК несет на своем 3'-конце остаток активированной аминокислоты, которая должна быть доставлена в пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) рибосомы в случае, если антикодон тРНК соответствует кодону мРНК в А-сайте малой субъединицы рибосомы. После пептидилтрансферазной реакции тРНК оставляет рибосому, последовательно сменяя сайты связывания, основные из которых именуется как А-, Р- и Е-сайты (рис. 2.1, А), которые присутствуют как на малой, так и на большой субъединицах рибосомы.

Аминоацилированная тРНК доставляется в рибосому в составе т. н. тройного комплекса. В простейшем случае, у бактерий, она связана с элонгационным фактором Tu, EF-Tu, связавшим ГТФ (aa-тРНК•EF-Tu•GTP комплекс). Для распознавания кодона тройной комплекс связывается с А-сайтом на малой субъединице и с L7/L12-протуберанцем большой субъединицы, формируя гибридное А/Т-состояние. Правильное связывания кодона и антикодона аллостерически стимулирует гидролиз ГТФ EF-Tu, что приводит к диссоциации тройного комплекса. Следующая стадия проверки соответствия антикодона называется аккомодацией, в ходе которой отсеиваются “почти соответствующие” тРНК, у которых не соответствует кодону лишь последний нуклеотид, который, однако, способен образовать в декодирующем центре (ДЦ) неканоническую пару оснований вместо уотсон-Криковской. В процессе аккомодации ССА-конец полностью соответствующей тРНК занимает А-сайт большой субъединицы рибосомы, в то время как близкая к соответствию тРНК диссоциирует из А-сайта малой субъединицы рибосомы.

В Р-сайте рибосомы при этом уже расположена тРНК, этерифицированная пептидным фрагментом (или остатком N-формилметионина, связавшегося в Р-сайте в процессе инициации трансляции). Следующим этапом должен произойти перенос пептидного фрагмента на А-тРНК, или пептидилтрансферазная реакция (ПТР), о которой речь пойдет в следующем разделе.

В настоящее время известно, что в процесс связывания тРНК в А-сайте могут вмешаться мутации, удаленные от этого сайта. Например, замена основания A2531, формирующего одно из третичных взаимодействий спиралей H91 и H95 в 23S рРНК,

на пиримидины, существенно снижает сродство тройного комплекса к А-сайту рибосоме, хотя сродство пептидил-тРНК к Р-сайту остается прежним, равно как и другие функции рибосомы [67]. Иначе говоря, мутация изменила лишь состояние А-сайта, не внося неизбирательных искажений в структуру и функцию рибосомы, т. е. подействовала как аллостерический эффектор, ведь она отделена от А-сайта расстоянием не менее 50 Å. Также это должно означать существование у А-сайта не менее двух состояний, одно из которых имеет существенно меньшее сродство к тРНК, чем другое.

Сродство А-сайта к тРНК уменьшает еще одна мутация, искажающая вторичную структуру H89: это замещение двух уридинов U2492 и U2493 на один цитидин, иначе говоря, мутация UU2492-3C [68]. Эта мутация, в отличие от предыдущих, летальна и уменьшает сродство А-сайта к тройному комплексу в еще большей мере.

2.2.2.2 Потенциальная аллостерическая связь между А- и Е-сайтами связывания тРНК

Таким образом, сродство А-сайта к тРНК может аллостерически подавляться определенными мутациями в удаленных от него областях рибосомы. Это, как мы уже отметили, есть косвенное свидетельство существования как минимум двух состояний А-сайта; назовем одно из них, обладающее высоким сродством к тРНК, “открытым”, а другое, чье сродство понижено, — “закрытым”, поскольку оно должно “закрывать” для тРНК возможность связаться с этим сайтом. Из этого заключения следуют два вопроса. Первый — о функциональных возможностях этого переключения, т. е., о том, с какими функциональными элементами рибосомы аллостерически связан А-сайт и какова функциональная роль этих связей. Второй — о характере этой взаимосвязи, то есть является ли А-тРНК агонистом или антагонистом других лигандов.

Один из возможных ответов на этот вопрос еще три десятилетия назад был дан К. Ниерхаусом и Х. Райнбергером, впервые выявившими отрицательную кооперативность между тРНК, связывающимся в А- и Е-сайтах [69–71]. Согласно полученным ими данным, сродство деацелированной тРНК к Е-сайту, определяемой кодон-антикодоновыми взаимодействиями, заметно снижалась, при связывании aa-тРНК (например Thr-tRNA^{Thr}) в А-сайте. С другой стороны, связывание тРНК в Е-сайте при благоприятных ей условиях вытесняло предварительно связанную aa-тРНК из А-сайта [70]. В этих экспериментах по исследованию взаимодействия А- и

Е-сайтов в рибосомном туннеле Р-тРНК была этерифицирована N-ацетилпролином.

Позже Ниерхаус и сотр. выдвинули гипотезу о том, что взаимная аллостерическая регуляция связывания тРНК в А- и Е-сайтах, опосредованная мРНК, поддерживает рамку считывания [72] и снижает частоту ошибок в ходе декодирования [73; 74]. В согласии с этой гипотезой, тРНК, связанная в Е-сайте, с одной стороны, предотвращала случайный сдвиг рамки считывания [75], но при этом способствовала запрограммированному сдвигу [76; 77]. Исходя из этих данных, можно ожидать, что взаимодействия А- и Е-сайтов напрямую участвуют в управлении смещения мРНК при транслокации.

Однако, предположение Ниерхауса об антагонизме связывания тРНК в А- и Е-сайтах рибосомы долгое время было предметом ожесточенной дискуссии. Согласно другим данным, представленным научной группой М.В. Родниной и В. Винтермайера, в бесклеточной системе с высокой концентрацией ионов Mg^{2+} , а также полиаминов, связывание в А-сайте тройного комплекса с Phe-тРНК^{Phe} не ускоряло высвобождение деацилированной tRNA^{fMet} из Е-сайта, поскольку измененная среда системы усиливала ее удержание [78]. В Р-сайте в этом эксперименте находилась тРНК с коротким пептидом fMFT.

И, хотя споры относительно отрицательной обратной связи между А- и Е-сайтами рибосомы нельзя еще считать окончательными (для обзора см. [79]), в более современных исследованиях можно найти примиряющие эти противоположные позиции результаты. В частности, изучение связывания тРНК методом smFRET в реальном времени позволило получить данные относительно устойчивости тРНК в А- и Е-сайтах на разных циклах элонгации пептида. Было показано, что возможность наблюдения антагонизма между А- и Е-сайтами, зависит, большей частью, от длины растущего в рибосомном туннеле (РТ) пептида, и, на начальных этапах его роста — от аминокислотного состава этого пептида (рис. 2.10). В этой работе т. н. механизм Ниерхауса (с наблюдаемым антагонизмом) срабатывал лишь на первых циклах синтеза пептида, а механизм Родниной-Винтермайера (без видимого антагонизма) — на последующих, преобладая примерно с четвертого цикла присоединения аминокислоты [80]. Это совпадает с данными самих экспериментаторов, поскольку в случае Ниерхауса и Райнбергера в РТ находился лишь остаток N-ацетилпролина, а в случае Родниной и Винтермайера — полноценный пептид fMFT.

Также важно отметить, что дилемма о наличии или отсутствии антагонизма между А- и Е-сайтами могла бы быть решена только при рассмотрении целой

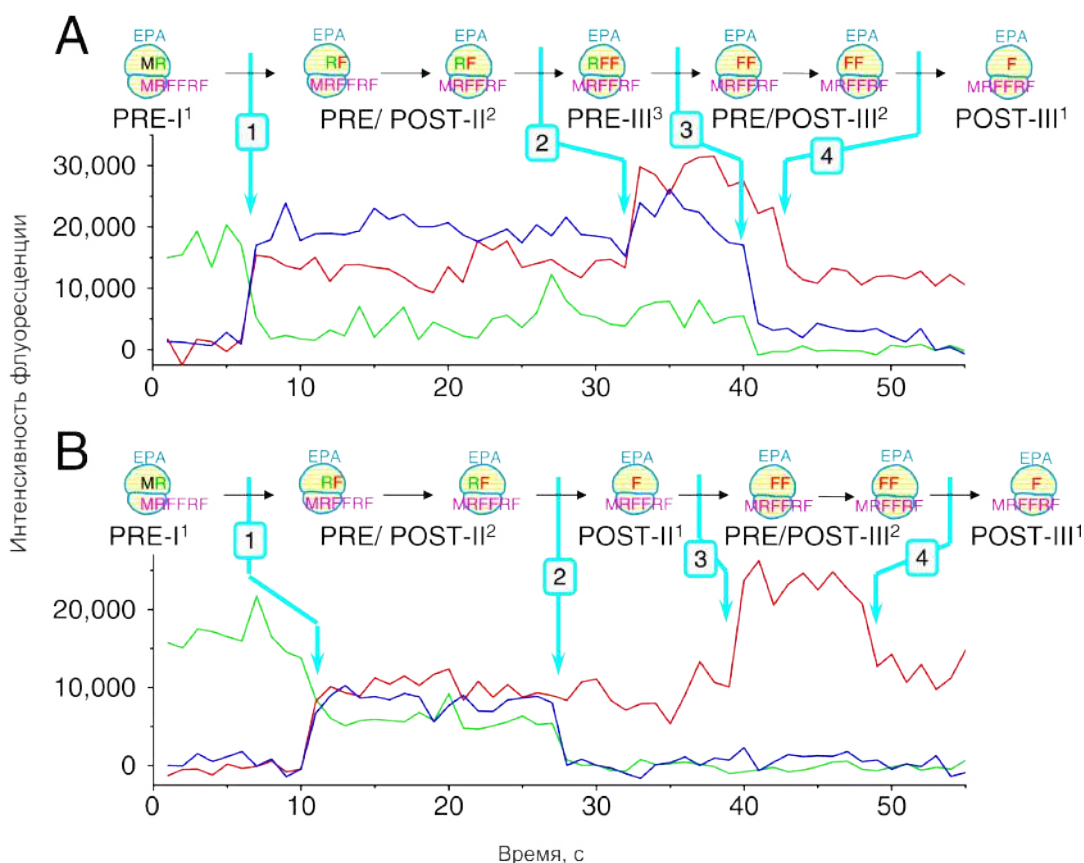


Рис. 2.10. Флуоресцентное отслеживание порядка связывания тРНК с рибосомой в ходе трансляции пептида MRFFRFYRF согласно соответствующей мРНК. Флуоресцентная метка Су3 на тРНК дает зеленый сигнал и индуцирует флуоресценцию Су5 голубым при 532 нм возбуждающем излучении вместе с красной флуоресценцией Су5 при возбуждающем излучении с длиной волны 640 нм **А.** Наблюдается совместное удержание А- и Е-тРНК в рибосоме с аллостерическим их антагонизмом друг с другом **В.** Е-тРНК самопроизвольно диссоциирует до связывания тройного комплекса [80]..

рибосомы в присутствии мРНК и функциональных молекул тРНК, поскольку ССА-фрагменты тРНК способны связываться одновременно в А- и Е-сайте большой субъединицы, и связывание одного из них не искажает сколько-нибудь заметно геометрические характеристики взаимодействия другого концевой фрагмента тРНК в 50S субъединице *H. marismortui* [81]. Необходимость дальнейшего исследования этого взаимодействия подтверждает то, что аллостерическая взаимосвязь А- и Е-сайтов была установлена посредством мутагенеза: мутация С2820U в А-сайте *S. cerevisiae* рибосомы (С2452 *E. coli*) увеличивает доступность для химической модификации двух остатков (А2778 и А2779) Н88 25S рРНК, расположенных в непосредственной близости от Е-сайта большой субъединицы [82].

В заключение раздела отметим, что, хотя некоторые кристаллические структуры рибосом *T. thermophilus* и содержат тРНК во всех трех классических сайтах, практически везде (например, можно привести PDB id рибосом *T. thermophilus* с тремя

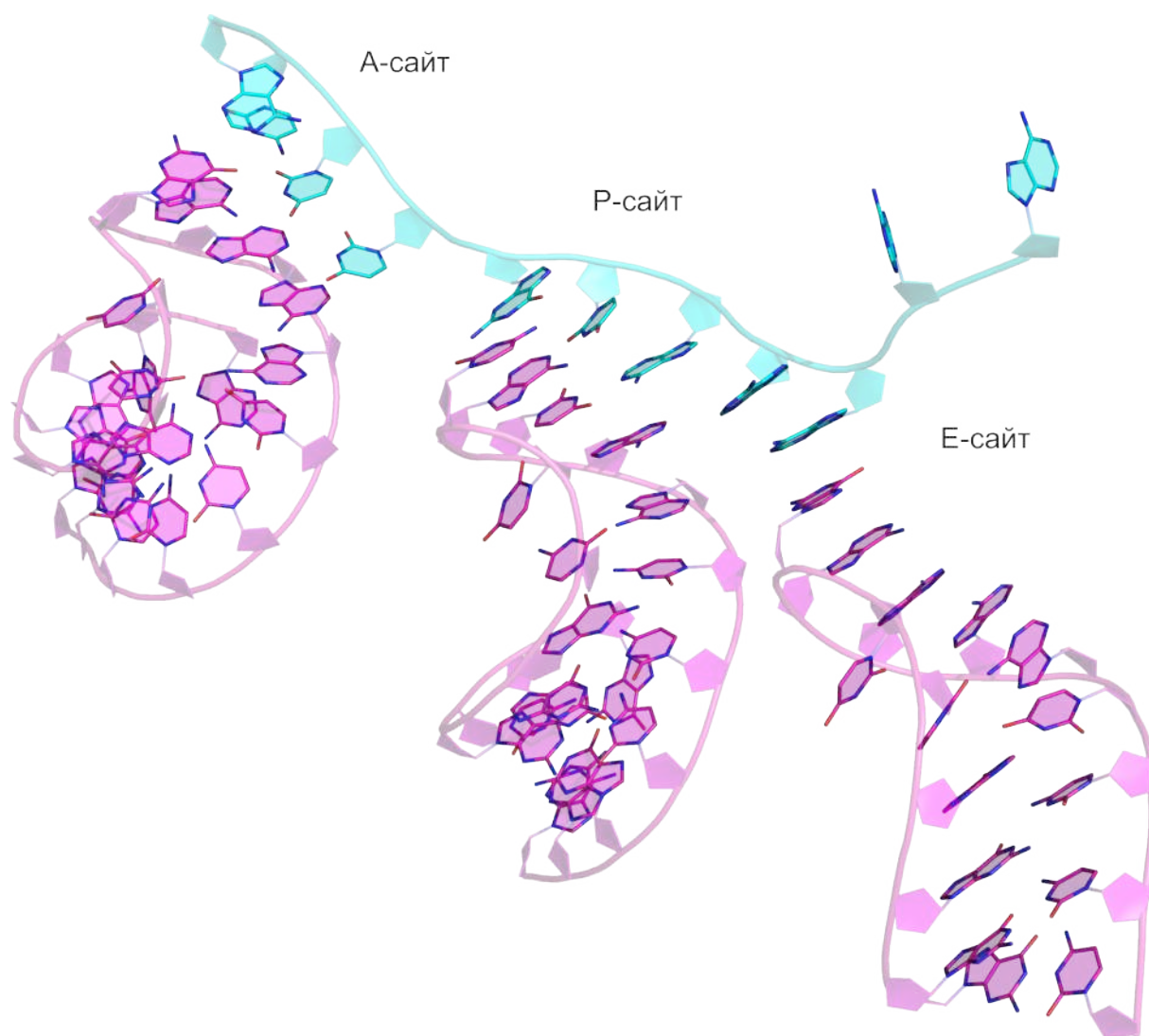


Рис. 2.11. Взаимное расположение мРНК и антикодоновых петель тРНК в А-, Р- и Е-сайтах при их одновременном занятии. Фрагменты антикодоновых шпилек тРНК, занимающие свое положение в рибосомном комплексе, показаны пурпурным цветом, а мРНК — голубым. Видно, что в присутствии А-тРНК в Е-сайте антикодоновая петля тРНК смещена и расположена под мРНК. [PDB id: 4V51].

тРНК: 5J4C, 5J4B, 5J8B, 4WPO, 4V51, 5VP2, 4V5C, 4V5D, 4V8N, 4WT8 и др.) кодон-антикодонные взаимодействия в Е-сайте полностью нарушены, и вся антикодоновая петля располагается ниже кодона мРНК (см. рис. 2.11). При этом, в структурах с тремя тРНК, где первая тРНК занимает А/Т сайт, кодон-антикодоновые взаимодействия в Е-сайте присутствуют (как пример можно привести структуру PDB id: 4V5G). Поскольку кодон-антикодоновые взаимодействия функционально важны для Е-тРНК и фактически формируют Е-сайт для тРНК в малой субъединице, состояние тРНК без таковых взаимодействий нельзя считать полноценным связыванием в Е-сайте.

2.2.2.3 Аллостерическая регуляция декодирования и отбора антикодона тРНК.

Проверка соответствия антикодона тРНК кодону мРНК, проходит в рибосоме в два этапа. На первом aa-тРНК в составе уже упомянутого главой выше тройного комплекса связывается с формированием гибридного А/Т-сайта. Первые две пары кодона и антикодона стабилизируются т. н. А-минорными взаимодействиями остатков A1492 и A1493 16S рРНК и, кроме того, водородной связью с G530 также 16S рРНК. Формирование геометрически правильного кодон-антикодонного взаимодействия индуцирует перестройку значительной области малой субъединицы рибосомы, что, вслед за этим, активирует ГТФазную активность фактора EF-Tu. Гидролиз ГТФ приводит к ослаблению связей тройного комплекса и рибосомы. Второй этап сверки полного соответствия антикодона — это аккомодация aa-тРНК, для которой необходимо соответствие последних двух остатков антикодона коду мРНК. При их соответствии aa-тРНК диссоциирует из EF-Tu, а 3'-конец занимает А-сайт большой субъединицы. Если же должного соответствия на этой стадии нет, aa-тРНК вслед за фактором трансляции Tu покидает рибосому.

Аллостерические эффекты на этой стадии были выявлены во множестве случаев и относительно детально изучены благодаря пристальному вниманию к этой стадии элонгации.

Декодирующий центр (ДЦ) малой субъединицы, где распознается кодон-антикодонный комплекс, удален от ГТФазного центра EF-Tu на расстояние примерно 80 Å. Участники передачи сигнала об состоянии комплекса кодона с антикодоном в ГТФазный центр хорошо известны. В первую очередь, это сама молекула тРНК. Исследовательской группой В. Рамакришнана было показано, что в гибридном А/Т-состоянии, т.е при связывании тройного комплекса рибосомой третичная структура тРНК значительно отличается от таковой в свободном тройном комплексе [83]. Поэтому мутации в тРНК, изменяющие ее конформацию в А/Т-состоянии, даже достаточно удаленные от декодирующего центра, способны влиять на точность декодирования [84]. Наиболее изученная и широко известная мутация такого рода — это “супрессор Хирша”, мутация G24A D-петли тРНК^{Trp}, распознающая стоп-кодон UGA как кодон триптофана [85].

Во-вторых, это довольно обширный РНК-белковый домен малой субъединицы (также называемый “плечом” 30S субъединицы), на поверхности которого и

происходит декодирование. При образовании кодон-антикодонного комплекса с полным взаимным соответствием “плечо” малой субъединицы заметно компактизуется (иначе говоря, сменяет свое “открытое” состояние на “закрытое”), что далее индуцирует передачу аллостерического сигнала в ГТФазный центр фактора EF-Tu. При этом один из сегментов 16S рРНК упомянутого домена формирует контакт с EF-Tu [86]. Последующие события еще не изучены детально на молекулярном уровне, однако, известно, что важную роль в конформационных изменениях “плеча” малой субъединицы играют смежные друг с другом белки этой субъединицы uS4 и uS5. В течение длительного времени Далберг, О’Коннор и Грегори изучали воздействие мутаций этих белков на процесс декодирования и действие антибиотиков — ингибиторов этого процесса [87—89]. Они установили, что, например, нарушение контакта uS4 и uS5 посредством делеции некоторых остатков uS5 приводит к ухудшению точности декодирования мРНК и изменению чувствительности к антибиотикам другого белка uS12, также участника регуляции трансляции. Это действительно аллостерические эффекты, поскольку белки uS4 и uS5 ни с белком uS12, ни с ДЦ напрямую не взаимодействуют.

Важно отметить, что исследование ГТФазной активности фактора EF-Tu оказалось весьма удобным приемом для поиска источников аллостерических сигналов в целой рибосоме. К примеру, мутации в межсубъединичном мосте В8 (В от англ. *bridge*, номенклатура межсубъединичных мостов соответствует порядку их расположения, подробнее в [90]), состоящем из h8 и h14 16S рРНК со стороны малой субъединицы, и белков uL14 и uL19 со стороны большой, снижали ГТФазную активность EF-Tu [91; 92]. При этом расстояние от места мутаций до ГТФазного центра составляло несколько десятков ангстрем.

Относительно межсубъединичного моста В8, известно, что он сам по себе связан негативной аллостерической связью с ГТФазным центром EF-Tu: его разрушение посредством усечения одной из составляющих его спиралей рРНК [91] или разобщение путем внесения мутаций, таких, как, например, G347U, понижало чувствительность ГТФазной активности к степени соответствия кодона и антикодона. Конформационные изменения в мосте В8, также сопровождающиеся учащением ошибок декодирования, в мосте В8 индуцировались также мутацией G299A h12 16S рРНК, отнесенной от него на расстояние примерно 77 Å, что следует из данных криоэлектронной микроскопии рибосом, содержащих описанные мутации в сравнении с рибосомами дикого типа [92].

На точность декодирования могут влиять, помимо изменений в РНК и белках 30S субъединицы, мутации в большой субъединице, как в 5S рРНК [93], так и в 23S рРНК, к примеру, в ее спиральных H92 или H89, на десятки ангстрем удаленных от ДЦ [94]. Этот факт снова указывает на участие всей рибосомы, собранной в комплекс из двух субъединиц, в регуляции ее узловых функциональных центров.

2.2.3 Аллостерическая регуляция пептидилтрансферазной реакции.

Следующая за аккомодацией пептидилтрансферазная реакция (ПТР) — каталитическое формирование новой пептидной связи — является основной функцией рибосомы, посредством которой происходит присоединение нового аминокислотного остатка к растущему пептиду в соответствии с информацией о последовательности белка, зашифрованной в мРНК. Ее протекание подвержено аллостерической регуляции и часто именно она становится мишенью для антибиотиков, зачастую тоже действующих аллостерически. Пептидилтрансферазный центр рибосомы (ПТЦ), непосредственно катализирующий реакцию транспептидации, состоит преимущественно из остатков рРНК большой субъединицы, почему рибосому и относят к рибозимам, т. е. каталитическим РНК. Остатки рРНК ядра каталитического центра, подобно активному центру белкового фермента, обеспечивают оптимальное взаимное расположение субстратов будущей реакции, в данном случае — аминокислоты, связанной с А-тРНК (именуемой А-субстратом), и карбонильной группы сложного эфира С-концевого остатка аминокислоты растущего пептида с Р-тРНК (Р-субстрат).

Принято выделять в ПТЦ как минимум два слоя нуклеотидных остатков. Первый — это остатки, непосредственно взаимодействующие как с А-, так и с Р- субстратами ПТР. Согласно нумерации нуклеотидных остатков рибосомы *E. coli* это нуклеотиды A2602, U2585 и A2451. Второй слой — это нуклеотиды, взаимодействующие с остатками из первого слоя, а именно нуклеотиды G2061, C2063, A2447, A2450, C2452, U2506, а также G2553 и G2251-G2252, с которыми ССА-концы обеих тРНК формируют комплементарные пары, поддерживая оптимальную конформацию субстратов ПТР в реакционном центре [95–97]. Поэтому воздействие на ПТР через остатки первого и, зачастую, второго из слоев, как правило, не относят к аллостерическим явлениям. Впрочем, уже на расстоянии 10–20Å от первого слоя были обнаружены остатки

pРНК и белков 50S субъединицы, изменения в которых важны как для активности как ПТЦ, так и для воздействия на последний ряда антибиотиков — ингибиторов транспептидации (см., например, [98]).

Молекулярные детали пептидилтрансферазной реакции до сих пор являются предметом спора, во многом потому, что неясной остается роль аллостерии, т. е. влияния состояния других участков огромного рибозима на этот процесс. Однако, стоит отметить, что гидролиз сложноэфирной связи Р-тРНК и пептида может происходить независимо от переноса растущей пептидной цепи на aa-тРНК: например, связывание даже свободной тРНК в А-сайте инициирует гидролиз с образованием свободных пептидной цепи и Р-тРНК. Подобный механизм лежит в основе действия и релизинг-фактор (RF) в процессе терминации трансляции [99]. Однако, такое высвобождение пептида ослабляется при мутациях U2585, A2451, C2063, A2062; последние два нуклеотида при этом находятся не непосредственно в ПТЦ, а в верхней области рибосомного туннеля (РТ) — выходного канала, по которому из рибосомы выходит вновь синтезированная полипептидная цепь [95; 96]. Так что уже в этом примере наличествует короткодействующая аллостерическая взаимосвязь ПТЦ с РТ, которую мы подробнее обсудим в следующем разделе. Таким образом, для полноценного протекания ПТР требуется не только правильная ориентация субстратов в активном центре, но и определенное конформационное состояние окружающих остатков, даже тех, что прямо не контактируют с субстратами реакции.

О механизме воздействия тРНК в А-сайте на состояние пептидил-Р-тРНК было сделано одно предположение. Рассматривая кристаллические структуры 50S субъединиц рибосомы *H. marismortui*, исследователи обнаружили определенные конформационные изменения, которые А-тРНК вызывает в ПТЦ своим ССА-фрагментом. В структуре с А-тРНК ее ССА-конец через остаток C74 находится в стэкинге с U2555 23S рРНК (здесь и далее нумерация остатков следует структуре *E. coli*), а 3'-концевой остаток A76 — в А-минорном взаимодействии с G2583, формирование которого разрушает пару G2583 с U2506, формируемую водородными связями азотистых оснований, по результатам диссоциации которых U2506 разворачивается примерно на 90°. В конечном итоге, воздействие ССА-конца тРНК на А-сайт по цепи взаимодействий упомянутых оснований передается до U2585 (рис. 2.12). При пустующем А-сайте U2585 экранирует сложноэфирную группу, соединяющую растущий пептид и Р-тРНК; при занятии А-сайта это основание смещается, и эфирная группа становится доступной, а 2'-гидроксигруппа

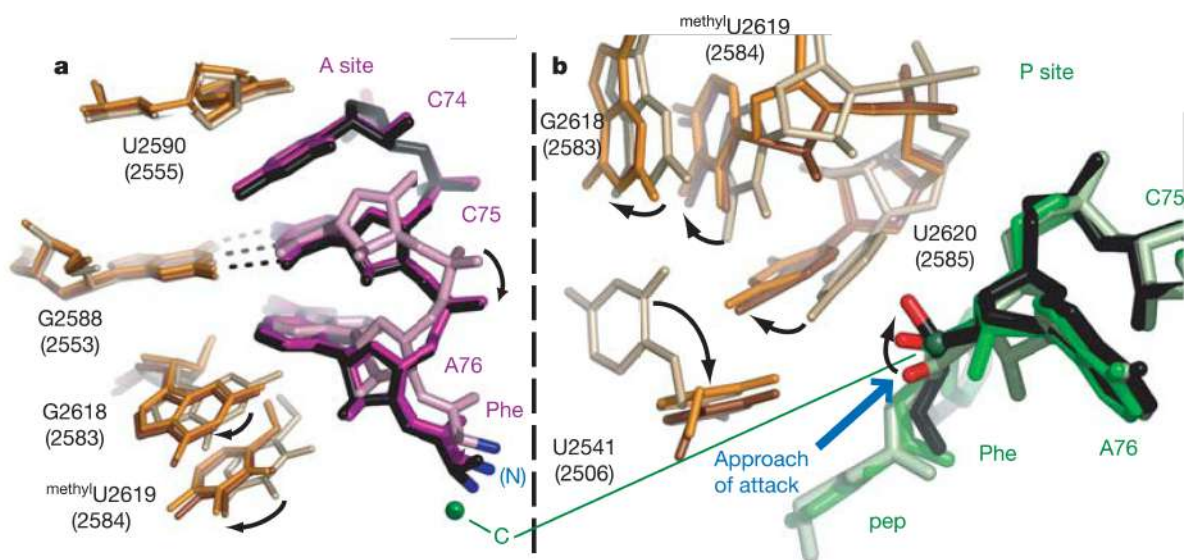


Рис. 2.12. Смещения рРНК и пептидил-тРНК, возникающие при корректном связывании субстрата в А-сайте рибосомы *H. marismortui*. **а.** Состояние А-сайта в трех комплексах. Без C74, в А-сайте ChPmн (розовый, тРНК показана пшеничным цветом) располагается выше. С C74, в случае как CChPmн (СС-гидроксипуромидин; сиреневый, тРНК оранжевая), так и TSA (черный, тРНК коричневая), C74 образует стэкинг-взаимодействие с U2590 (U2555 *E. coli*), что смещает субстраты А-сайта вниз с выдвиганием α-аминогруппы ближе к атому углерода сложноэфирной группы Р-субстрата (отображен зеленым). G2618 (G2583) смещается, обеспечивая А-минорное взаимодействие А-субстрата в сайте. Это смещение разрушает его пару с U2451 (U2506), разворачивая последний на 90°. При этом метил-U2619 (U2584) и U2620 (U2585) сдвигаются, позволяя эфирной группе Р-субстрата разворачиваться в положение, доступное для атаки [100].

концевого A76 Р-тРНК может быть вовлечена в т.н. протонный челнок, который, по общему представлению, катализирует аминолиз сложноэфирной связи [100]. Согласно оценке энергетических характеристик конформаций аминогруппы аа-тРНК, индуцированное связыванием А-тРНК состояние ограничивает подвижность производящей в ПТР нуклеофильную атаку амоногруппы, стабилизируя ее ротамер, максимально благоприятный для этой атаки; напротив, в не-индуцированном состоянии ее ротамер, вывернутый от направления нуклеофильной атаки, оказывается гиперстабилизирован водородными связями с U2585. Вышеописанное индуцирование ПТЦ ССА-фрагментом, занимающим А-сайт, отодвигает U2585 так, что он не может заякорить нереакционноспособное состояние, а также создает стерическое противоречие со смещенным положением U2506 [101].

Индуцирование ПТЦ имеет определенные биохимические маркеры: это событие сопровождается резким увеличением зависимости степени химической модификации A2451 от рН среды [102].

2.2.3.1 Остановка трансляции растущим пептидом в РТ

Помимо того факта, что связывание ССА–конца тРНК в А–сайте большой субъединицы переключает весь ПТЦ в индуцированное состояние, влияние на последний может быть оказано и из чуть более удаленных участков рибосомы, каковым является верхняя часть РТ.

Многочисленные сведения об аллостерической остановке ПТР после нескольких элонгационных циклов, в результате которых в РТ оказывались связаны т. н. стоп–пептиды (stalling peptides в англоязычной литературе), были впервые систематизированы в 2011 году [103]. Авторы этого обзора подчеркивали, что, в первую очередь, остановку трансляции определяет последовательность аминокислотных остатков растущего пептида, а не тип А–тРНК. Помимо этого, для остановки трансляции важными являются лишь несколько аминокислот пептида, как правило, на его С–конце, т. е. аллостерический сигнал улавливает верхняя, находящаяся в непосредственной близости от ПТЦ, часть туннеля. Выделяются даже целые классы стоп–пептидов по их С–концевой критически важной последовательности, например, среди пептидов, вызывающих остановку трансляции в присутствии макролидных антибиотиков, существуют IAVV/T, IFVI и RLR стоп–пептиды. Подобные пептиды срабатывают при наличии в верхней части рибосомного туннеля антибиотика, и они чувствительны к химической структуре последнего; однако, существуют стоп–пептиды, останавливающие трансляцию и без дополнительных лигандов, например, SecM пептид, задерживающий биосинтез определенных белков ради их последующей доставки в эндоплазматический ретикулум.

Мутагенез остатков рРНК верхней части РТ бактериальной рибосомы (а он построен именно из остатков 23S рРНК) выявил ряд остатков, изменение которых ослабляет либо предотвращает действие стоп–пептидов. При этом различные мутации препятствовали действию разных стоп–пептидов (табл. 2.3), что свидетельствует в пользу существования нескольких независимых путей передачи сигнала из РТ в ПТЦ, которые дублируют и дополняют друг друга. Так, например, мутации остатков A2503, A2062, U1782 и U2609, нарушающих действие стоп–пептидов ermCL и ermAL1, а также вышеупомянутого SecM, при этом практически не влияют на эффект от ErmBL или ErmDL [104]. С другой стороны, те мутации, что практически отменяют остановку пептидного синтеза посредством TnaC–репортера (а именно, мутации остатков G2583 и U2584) никак не влияют на эффективность действия ermAL1,

Таблица 2.3. Воздействие мутаций в 23S рРНК *E. coli* на пептидно-зависимую остановку ПТР [103].
 Прочерк означает отсутствие эффекта, плюс — мутация препятствует остановке трансляции соответствующим пептидом, два плюса — сильно выраженный эффект мутации, знак вопроса — нет данных.

Точечные мутации	Егу-зависимые				Независимые	
	ermAL	ermBL	ermCL	ermDL	secM	tnaC
A750 (+A)	-	-	-	-	++	++
U790 (G)	-	-	?	-	?	?
U1782 (C)	++	-	?	-	?	?
A2058 (G)	++	++	++	++	++	-
A2059	++	++	++	++	?	?
A2062 (U)	++	-	++	-	++	-
A2503 (G)	++	-	++	-	++	-
G2583 (A)	-	-	?	-	?	++
U2584 (C)	-	-	?	-	?	++
U2586 (C)	+	-	-	-	?	?
A2587 (G)	+	-	?	-	?	?
U2609 (C)	+	-	+	-	+	++

ermCL, или secM [104—106]. В список потенциальных участников передачи сигнала также вошли нуклеотиды A2058, A2059, U2586 и A2587. Часть из них — A2058, A2059, A2503, A2062 — формируют стэкинг-“лестницу” из РТ в ПТЦ, а другая — остатки 2583-2587 — располагаются непосредственно у ПТЦ и смещаются при связывании А-тРНК. Как предполагалось предыдущем разделе, это смещение индуцирует ПТЦ, способствуя гидролизу (или аминолизу) связи растущего пептида с Р-тРНК.

Таким образом, в настоящее время уже накопилось достаточно сведений о том, что существует несколько независимых (или слабо зависимых) путей передачи информации от растущего пептида в ПТЦ.

Также делеции и мутации остатков белка L22, обращенных в просвет туннеля, могут нарушать прохождение сигнала от стоп-пептидов [107—110]. Способность изменять воздействие пептидов на ПТЦ также была обнаружено у белков L4 и L23, имеющих выход в просвет РТ [108; 111].

В заключение авторы отмечают, что аллостерический сигнал от стоп-пептида реализуется, скорее всего, в А-сайте ПТЦ, причем от разных пептидов — в разной степени. Так, после синтеза пептида ErmCL практически никакая аминокислота не может быть присоединена к нему, в то время как, синтез другого стоп-пептида, ErmAL1, лишь частично ограничивает возможности А-сайта, и некоторые аминокислоты, поступая в него, могут продолжить наращивание полипептидной цепи [112].

Дальнейшие исследования позволили узнать несколько больше о взаимодействии пептидов с рРНК рибосомы в кооперации с малыми лигандами. В частности, в 2014 году была опубликована структура рибосомы, фиксированной пептидом ErmCL и эритромицином, в которой можно различить конформационные изменения остатков U2585 и A2062, вызывающих смещение А-тРНК с ее канонического положения, необходимого для нуклеофильной атаки аминокислоты в ПТР [113]. Также тесные контакты ErmCL с остатком кладинозы 14-членных макролидов согласуются с известными биохимическими данными о том, что их аналоги кетолиды не индуцируют остановку синтеза в присутствии стоп-пептидов [107]. Во взаимодействии с кладинозой участвует остаток C2610, чья замена на U существенно снижает ответ рибосомы на ErmCL в присутствии антибиотика [114].

Один из остатков, A2058 удален от первого слоя ПТЦ примерно на 20 Å, и именно он отвечает за связывание макролидных антибиотиков в туннеле. Связываясь с ним, 14-членный макролид эритромицин аллостерически индуцирует изменения положения остатка U2585 относительно других остатков первого и второго слоев ПТЦ [115]. Остановка трансляции в этом случае легко объяснима, так как ранее было показано, что возмущение естественной конформации первого слоя остатков ПТЦ, в особенности U2585, неизбежно приводит к его инактивации [116].

Несколько лет назад Макаровым и сотр. посредством молекулярно-динамического моделирования рибосомного фрагмента, содержащего полностью РТ и ПТЦ, была выявлена возможность координированной передачи аллостерического сигнала для некоторых состояний рибосомы посредством образования сплошных стэкинг-взаимодействий в следующей очередности: A2058, A2059, m²A2503, G2061, A2062, C2063, U2585. Для формирования такого каскада стэкинг-взаимодействий остаток A2058 должен отделиться от основной стопки H73, т. е. разорвать стэкинг-взаимодействие с остатком G2057 [117]. Ближе к ПТЦ азотистое основание A2062 встраивается между G2061 и C2063, а U2585 первого слоя ПТЦ, завершает каскад стэкинг-взаимодействием с C2063.

Таким образом, мы можем с уверенностью сказать, что ПТЦ подвержен аллостерическому регулированию, и эта возможность широко используется природой и человеком. Закономерным образом возникает вопрос, способен ли ПТЦ обмениваться аллостерическими сигналами с какими-либо другими функциональными центрами. Некоторые намеки о существовании такой возможности были получены методом направленного мутагенеза рибосомы, сопряженного с химическим зондированием

мутантных рибосом. Эти исследования показали, что мутация UU2492-3С в Н89 на расстоянии около 30 Å от ПТЦ, подавляет его функциональную активность и, как следовало ожидать, вызывает конформационные перестройки остатков, формирующих его. Искажение геометрии спирали Н89 сказывается на доступности его оснований к модифицирующим агентам в т.н. сарцин-рициновой петле, или Н95, 23S рРНК (SRL), в месте связывания элонгационных факторов [68]. Это позволяет предположить наличие аллостерической связи между SRL и ПТЦ.

Другой пример можно привести из одной из работ Динмана с сотр., также систематически изучавших аллостерические явления в рибосомах с помощью мутагенеза и химического зондирования. Ими были исследованы воздействие мутаций в структурном элементе рибосомы, носящим название «мост В1b/c» и соединяющим малую и большую субъединицу 80S рибосомы. В его организации участвует, например, сугубо эукариотический белок eL11 центрального протуберанца большой субъединицы рибосомы. Он расположен на солидном удалении от ПТЦ, но это не мешает, мутациям в eL11 затрагивать как ПТЦ, так и последовательную цепь спиралей 25S рРНК, по которой предположительно передается аллостерический сигнал [118].

Помимо этого, ПТР чувствительна к общему нарушению структуры рибосомы: например, удаление 5S рРНК, соединяющей V и II домены 23S рРНК, сильно ее ингибирует, но эффект от изъятия этой рРНК может быть отчасти компенсирован антибиотиком, соединяющим эти домены вместо 5S рРНК [119]. Все это дополнительно свидетельствует в пользу существования обширной аллостерической сети внутри рибосомы.

2.2.4 Аллостерические эффекты в процессе транслокации.

Деацилированная тРНК после транспептидации смещается из Р– в Е–сайт, а пептидил–тРНК со вновь синтезированным пептидом — из А– в Р–сайт, проходя через ряд промежуточных конформационных состояний тРНК и самой рибосомы [120]. Этот процесс именуется транслокацией.

2.2.4.1 Взаимодействие L1 протуберанца с тРНК

Транслокация молекул тРНК требует согласованного макроскопического смещения друг относительно друга довольно крупных по молекулярным меркам элементов рибосомы. Проиллюстрируем это примером. Одно из промежуточных состояний

при транслокации — занятие молекулами тРНК гибридных сайтов, когда их антикодоновые петли еще связаны с малой субъединицей рибосомы в сайтах А– и Р–, но их ССА–концевые фрагменты при этом уже сместились, соответственно, в Р– и Е–сайты большой субъединицы. Такие состояния тРНК обозначаются как гибридные А/Р– и Р/Е–сайты 2.13. Формирование гибридных сайтов в рибосоме оказывается возможным за счет серьезных смещений ее макроструктурных элементов друг относительно друга. При смещении тРНК из классического Р– в гибридное Р/Е–состояние протуберанец L1 большой субъединицы рибосомы (его название происходит от белка uL1) изгибается к поверхности раздела субъединиц, и его вершина смещается при этом примерно на 20 Å. Это смещение сближает вершину протуберанца с локтем Р/Е–тРНК и позволяет его таким образом фиксировать. Подобное состояние протуберанца именуется “закрытой” конформацией в отличие от “открытой”, наблюдаемой до начала процессов транспептидации и транслокации, когда тРНК находятся в канонических А/А– и Р/Р–сайтах. Оба состояния протуберанца находятся в динамическом равновесии.

Еще одно ключевое событие этого этапа элонгации пептида — это поворот 30S субъединицы на 8 Å против часовой стрелки (если смотреть на рибосому со стороны малой субъединицы) относительно 50S субъединицы и сопряженное с этим латеральное смещение условной «головы» малой субъединицы уже на 20 Å.

мРНК при образовании гибридных сайтов тРНК перемещается на один кодон по направлению к Е–сайту [121].

Взаимная согласованность движений тРНК и L1–протуберанца установлена экспериментально методом smFRET для основных этапов транслокации: для формирования гибридного Р/Е–состояния из канонического Р/Р–[122], связывания тРНК с L1 протуберанцем [123], а также для поворота малой субъединицы относительно большой [124; 125]. Поскольку было подтверждено, что эти три процесса теснейшим образом взаимосвязаны, то для транслокации можно обобщить существование двух глобальных состояний, часто обозначаемых цифрами 1 и 2 (global states 1 и 2, или GS1 и GS2). В претранслокационном состоянии, когда смещения мРНК еще не произошло, эти два состояния находятся в динамическом равновесии друг с другом. В первом из них тРНК находятся в канонических А– и Р–сайтах, L1–протуберанец — в “открытой” конфигурации, а субъединицы еще не смещены друг относительно друга. Во втором состоянии транслокация продвинулась дальше: 3’-концевые фрагменты тРНК смещаются на одну позицию вперед по направлению к

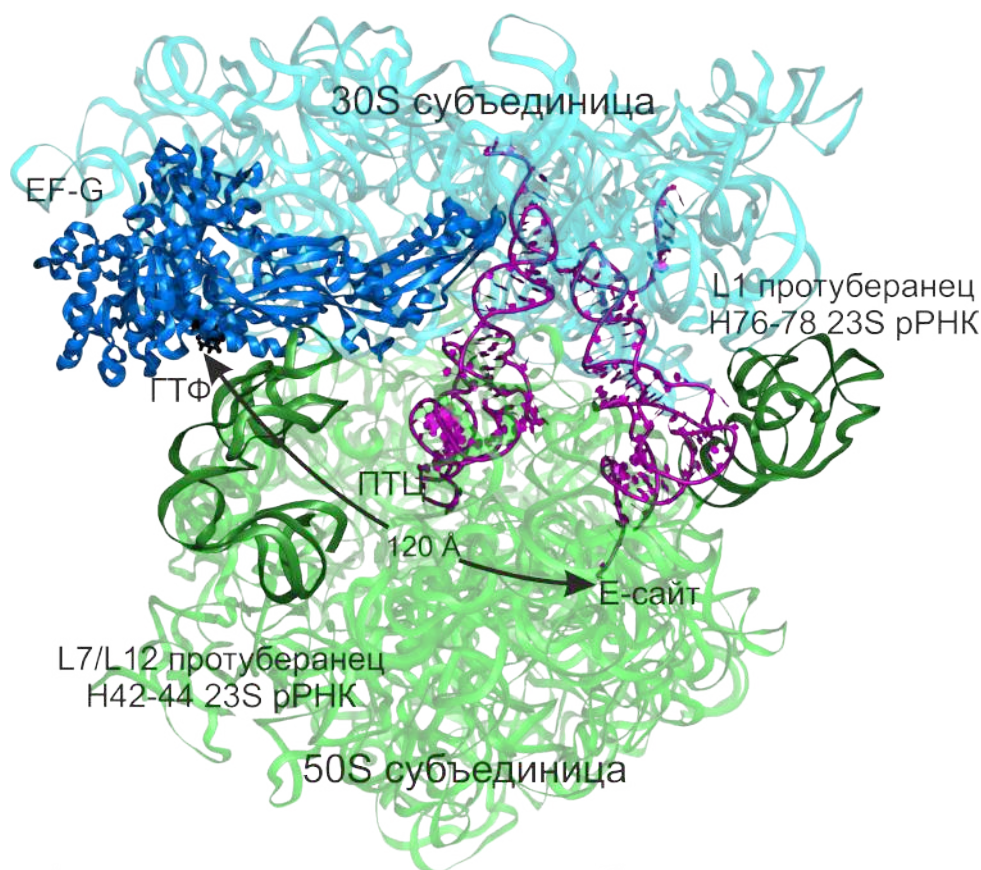


Рис. 2.13. Рибосома в претранслокационном состоянии с тРНК, показанными пурпурным цветом, в следующих гибридных сайтах (слева направо): А/Р и Р/Е. 16S рРНК малой субъединицы рибосомы изображена голубым цветом, 23S рРНК большой субъединицы — зеленым, где темно-зелеными широкими лентами отмечены L1- и L7/L12-протуберанцы. Элонгационный фактор EF-G показан ярко-синими лентами. Изображение получено на основе структуры из банка данных PDB id: 4V7D..

выходу из рибосомы, образуя этим гибридные сайты в рибосоме, L1-протуберанец повернут в “закрытую” конфигурацию, удерживающую тРНК в Р/Е-состоянии, а сама рибосома оказывается в т. н. разомкнутом состоянии (unlocked state), когда ряд межсубъединичных “мостов” действительно разомкнуты [126], что и обеспечивает взаимный поворот субъединиц друг относительно друга (рис. 2.13, trans).

Транслокация катализируется элонгационным фактором G (EF-G) посредством гидролиза ГТФ (рис. 2.1, А). Этот фактор, равно как и фактор EF-Tu, обладает центром с ГТФаз-ной активностью и связывается с участком GAC рибосомы (GTPase-associated center, H42-44 23S рРНК). Здесь обнаруживается рекордное расстояние, на которое аллостерические сигналы могут передаваться в рибосоме. Было показано, что EF-G определяет конформацию L1 протуберанца, удаленного на расстояние более 170 Å: даже без ацилированной тРНК в А- (или, при переходе, в А/Р-) сайте образование комплекса EF-G с рибосомой смещает равновесие между состояниями L1

протуберанца в сторону закрытого [127]. Механизм этой аллостерической передачи по сей день совершенно не ясен.

На претранслокационное равновесие между состояниями рибосомы также во множестве случаев влияют антибиотики класса аминогликозидов. Они связываются рядом с декодирующим центром (ДЦ) и А-сайтом малой субъединицы. Про них также известно, что, кроме нарушения работы ДЦ, они препятствуют процессу транслокации [128; 129]. Согласно данным FRET, определявшим межсубъединичное вращение в рибосоме, аминогликозид канамицин стабилизирует рибосому в закрытом состоянии, а другой аминогликозид виомицин — в открытом. Антибиотик того же класса, неомицин, связываясь с H69 23S рРНК на некотором удалении от ДЦ, формирующим межсубъединичный мост В2, при низких концентрациях аналогично стабилизировал закрытую конформацию протуберанца и рибосомы [130].

Положение L1-протуберанца относительно поверхности рибосомных субъединиц также может быть изменено аллостерически посредством нарушения межсубъединичных контактов. В частности, мутации, разрушающие контакты белков uL5 и uS13, формирующих мост В1b, способствуют уже описанному вращательному смещению малой субъединицы; одновременно эти мутации стабилизовали L1 протуберанец в «закрытом» состоянии.

Согласованность движений L1-протуберанца и малой субъединицы в рибосомах проявлялась даже в отсутствие тРНК. Эту взаимосвязь снова помогли установить антибиотики. Так, виомицин, связывающийся с H69, аллостерически стабилизирует «закрытое» состояние протуберанца L1 и смещенное положение малой субъединицы даже в полностью вакантной рибосоме [131].

Рассмотренные здесь переходы происходят в обобщенном состоянии рибосомы, которое называют претранслокационным (PRE), из которого она способна перейти и в целевое состояние стадии транслокации — посттранслокационное (POST), с тРНК в полностью канонических Р/Р- и Е/Е-сайтах и несмещенными субъединицами. Элонгационный фактор EF-G катализирует этот переход, и без него транслокация не идет со скоростью, достаточной для жизнеспособности клетки: ведь состояние PRE энергетически выгоднее состояния POST, поскольку при удалении из системы EF-G рибосома спонтанно возвращается в преимущественно PRE состояние.

Некоторые из аминогликозидов смещают равновесие между PRE и POST состояниями: неомицин ускоряет переход из PRE в POST в 3 раза, стрептомицин — в 14, а тетрациклин замедляет его вчетверо [132]. Спарсомицин, связывающийся

в ПТЦ, также заметно смещает это равновесие по направлению к POST, вызывая тем самым спонтанную бесфакторную транслокацию [133]. Аналогично спонтанную транслокацию индуцирует ряд антибиотиков, обладающих сродством к А-сайту 50S субъединицы [134].

Из всех собранных фактов можно однозначно заключить, что, как и переключение между различными состояниями претранслокационного комплекса, переход в посттранслокационное состояние целиком затрагивает рибосому с ее основными активными центрами: декодирующим центром, ПТЦ и А-сайтом.

2.2.4.2 Взаимодействие претранслокационного состояния рибосомы с элонгационным фактором G

ГТФазная активность EF-G зависима от выбора состояния претранслокационной рибосомы: только в GS2 состоянии с тРНК в гибридных сайтах наблюдается достаточная скорость гидролиза ГТФ, необходимая для высвобождения фактора EF-G, в то время как в GS1 состоянии она чрезвычайно низкая. Также известно, что связывание EF-G с рибосомой без тРНК слабо катализирует его ГТФазную активность: для полноценного катализа необходимо наличие деацелированной тРНК в Р-сайте, способной смещать свой ССА-концевой фрагмент в Е-сайт [135], несмотря на то, что фактор G связывается с рибосомой в любом из возможных претранслокационных состояний, и запускает транслокацию, исходя из любого из них [136]. Мутация нуклеотидного остатка C2394G в 23S рРНК, напротив которого как раз располагается 3'-концевой остаток A76 тРНК, занимающей Е-сайт большой субъединицы, была осуществлена для анализа взаимосвязи Е-сайта с ГТФазным центром EF-G. Эта мутация резко снижала сродство тРНК к Е-сайту большой субъединицы как для спонтанного связывания в Е-сайте тРНК^{fMet} при наличии fMetPhe-тРНК^{Phe} в Р-сайте, так для удержания деацелированной тРНК в Е-сайте после транслокации, и образования гибридного Р/Е-состояния. При этой мутации затруднено образование GS2, ниже скорость гидролиза ГТФ в EF-G и, помимо этого, ниже сродство самого фактора к рибосоме [137]. Элонгационный фактор G также управляет согласованностью транслокации, поскольку его ГТФазный центр чувствителен к претранслокационному состоянию рибосомы, являясь, таким образом, аллостерическим сенсором. Какая именно область его связывания на рибосоме ответственна за прием аллостерического сигнала, или же таких областей несколько, и

они все координированно активируют гидролиз ГТФ, из имеющихся данных понять сложно, поскольку, как было указано выше, перегруппировки в претранслокационной рибосоме происходят согласованно.

В другой работе было установлено, что делеция верхней части H38 23S рРНК, которая формирует межсубъединичный мост В1а совместно с белком S13 30S субъединицы, снижает эффективность активации гидролиза ГТФ фактором EF-G деацилированной тРНК, пребывающей в гибридном Р/Е состоянии. Поэтому можно ожидать, что передача аллостерического сигнала проходит одновременно по нескольким путям, которые дублируют и дополняют друг друга [138].

Также достоверно известно, что L7/L12 протуберанец, состоящий из спиралей 42-44 23S рРНК и рибосомных белков uL10 и uL11, участвует в формировании необходимого для гидролиза ГТФ фактором EF-G состояния рибосомы, поскольку удлинение его РНК-составляющей на одну пару в основании H42 добавлением еще одной уотсон-Криковской пары в дополнение к C1030/G1124 существенно подавляет ГТФазную активность фактора G. Важно отметить, что эта мутация вносит изменения в доступность ряда оснований 23S рРНК, удаленных от L7/L12 на значительное расстояние, к химическим реагентам, что свидетельствует о глобальных перестройках в рибосоме [139].

2.2.4.3 Отдельные свидетельства существования в рибосоме аллостерических взаимосвязей.

Также к настоящему времени экспериментально накоплено достаточно примеров, когда мутации в одном из рибосомных нуклеотидов изменяли конформации удаленных остатков, обнаруживаемых с помощью «химического зондирования» реагентами, модифицирующими основания РНК.

Так, мутация A960C изменяет конформацию некоторых остатков ПТЦ, делая более доступными основания Gm2251 и G2252, связывающие Р-тРНК, одновременно экранируя основания U2249 и A2518 [140].

Далее, мутации A2531C и A2531U в точке образования третичного контакта вершин H95 и H91, изменяют уровень химической модифицируемости некоторых оснований GAC, и в их числе остаток U1033, формирующий третичный контакт со спиралью H97, и остатки A2572 и U2585, расположенные в ПТЦ [67].

Азотистое основание остатка A2518 становится также более доступным для

химической модификации диметилсульфатом при нарушении целостности SRL в рибосоме наряду с определенными остатками спиралей H89, H90-92, H80, H72 и H39 (к последней, кстати, принадлежит выше обсуждавшийся A960), некоторыми нуклеотидами, образующими ПТЦ и стеблем H42, составной части GAC [141].

Все представленные здесь данные по влиянию изменений в различных точках рРНК на модифицируемость остатков в других частях рибосомы *E. coli* позволяют объединить общей аллостерической сетью взаимодействий SRL, трехсоставную структуру спиралей H90-92, остаток A2518 в составе стопки азотистых оснований, составленной также основаниями A1127-A1129, которая соединяет H90 и H89, GAC, ПТЦ и спираль H39, ведущей от ПТЦ по направлению к E-сайту.

Мутации белка eL3 в рибосоме *S. cerevisiae*, увеличивающую прочность связывания A- и P-рРНК, индуцируют конформационные изменения в спиральных, разнесенных более чем на 100 Å, повышая доступность значительной части остатков H85, но при этом экранируя остатки спиралей H89 (A2901, A2920), H91-92 (A2948, A2958, A2966, G2978; последний соответствует G2554 *E. coli* — остаток, непосредственно связывающий CCA-конец A-рРНК), H93 (A3015) и остаток U3009 (U2584 *E. coli*, остаток второго слоя ПТЦ со стороны A-сайта) [142]. Одновременность таких изменений еще раз подтверждает включенность в сеть аллостерических взаимодействий всех функциональных участков рибосомы и обширную область ее РНК.

Конформационная связность удаленных остатков рибосомы позволяет существовать устойчивости бактерий к антибиотикам, обеспечиваемой мутациями, которые отнесены от сайтов связывания антибиотиков на значительное расстояние. В случаях, когда речь идет об относительно небольших расстояниях (например, в [98]), при исследовании структурных данных удается выявить последовательность разрушения старых связей и образования новых в цепи остатков рРНК или белка, протянутой от области мутации до сайта связывания антибиотика. Ряд последовательных изменений, выявленных в этих работах, могли бы быть моделью для понимания аллостерии на более значительных расстояниях.

Удаление остатка серина Ser145 рибосомного белка uL3 бактерии *Staphylococcus aureus* обеспечивает последней резистентность к линезолиду, сайт связывания которого удален более чем на 20 Å от места введения модификации. Механизм передачи структурных изменений оказался следующим: сокращение одной из петель uL3 смещало спираль H90 по направлению от ПТЦ на примерно 2 Å, что в дальнейшем служило

причиной перестроек в сайте связывания линезолида. Максимальные конформационные изменения при этом были обнаружены у остатков 2504-2506, G2576, G2581, U2584 23S рРНК (нумерация *E. coli*) методом криоэлектронной микроскопии, что согласуется с данными о том, что мутации по этим нуклеотидам тоже вызывают устойчивость к данному антибиотику [143].

Анизомидин, еще один антибиотик, связывающийся своим ароматическим фрагментом в щели между A2451 и C2452 согласно нумерации *E. coli*, теряет средство к рибосомам *Haloarcula marismortui* при мутациях G2581A и G2576U, которые отдалены от сайта связывания не менее чем на 12 и 7 Å, соответственно. Первая мутация позволяет образоваться новой водородной связью G2576 с A2581 (сайтом второй мутации), при одновременном разрыве связи с U2506, что в свою очередь вызывает изгиб блока оснований 2504-2507; из этого блока U2504 связан с A2453, и произошедшее смещение в конечном итоге сужает область удержания антибиотика — щель между A2451 и C2452. Вторая мутация, G2576U, разрушает связь между G2576 и G2505, из которых последнее основание также принадлежит блоку 2504-2507, и этот разрыв становится причиной еще большего его изгиба, аналогичного таковому в предыдущем случае [144].

Все эти свидетельства дополнительно подтверждают существование в рибосоме глобальной сети аллостерических взаимодействий со множеством узлов и альтернативными аллостерическими путями между функциональными центрами.

2.2.5 Заключение

В изложенном литературном обзоре подробно обсуждены данные о том, что рибосома — адаптивная и гибкая молекулярная машина. На всех этапах элонгации удалось экспериментально засвидетельствовать скоординированность удаленных участков, механизм взаимодействия которых еще предстоит расшифровать в дальнейшем.

Обобщая, можно отметить две основные особенности рибосомы как аллостерически регулируемой системы:

1. Явления аллостерического характера наблюдаются в рибосоме на разных этапах элонгации и в различных функциональных центрах; для осуществления целого набора аллостерических взаимосвязей рибосома должна либо состоять из нескольких т. н. аллостерических “модулей”, или же иметь в своем конформационном пространстве

несколько околоравновесных конформаций, между которыми она переключается в процессе своей работы. Помимо этого возможна и наиболее вероятна комбинация этих двух вариантов, когда некоторые из рибосомных “модулей” зависимы друг от друга и в целом образуют дискретный набор состояний вблизи потенциального минимума, а для отдельных состояний “модулей” разрешены только определенные их комбинации.

2. Аллостерический сигнал распространяется по всей рибосоме на расстояния, весьма значительные по молекулярным меркам. Например, между E-сайтом 50S субъединицы рибосомы и сайтом связывания EF-G, регулируемого занятостью первого сайта, больше 100 \AA , что сопоставимо с размерами самой рибосомы. Также антибиотики, будучи относительно очень малыми эффекторами, стопорят процесс транслокации на одной из ее стадий, и осуществляют это как из пептидилтрансферазного, так и из декодирующего центров, что само по себе говорит о большой степени скоординированности транслокационного процесса и вовлечении в него множества функциональных центров. Это же подтверждается многочисленными экспериментами, проведенными методом smFRET, выявляющим крупноблочные смещения макроэлементов рибосомы или тРНК [80; 122–125; 130]. Управление ГТФазной активностью другого элонгационного фактора — EF-Tu — также затрагивает как минимум значительную, простирающуюся на 70–80 \AA , область малой субъединицы рибосомы и выходит в район межсубъединичного моста, а также подвержена влиянию мутаций рРНК большой субъединицы рибосомы. Отрицательная аллостерическая связь между A- и E-сайтами, если и существует, то одной большой субъединицы для ее осуществления недостаточно; следовательно, требуется согласованная работа всего трансляционного механизма. Изменения модифицируемости нуклеотидов могут также происходить на расстоянии десятков ангстрем от точечной мутации. Так что, если независимые аллостерические модули и существуют в рибосоме, их размеры сопоставимы с размерами самого комплекса. Кроме того, стабильное распространение сигналов на такие расстояния требует протяженных жестких элементов РНК.

Основные сенсоры аллостерических переключений, которые можно идентифицировать, исходя из всей совокупности экспериментальных данных, это:

- A-сайт и его способность связать aa-тРНК;
- ПТЦ; переключается между активным и неактивным состояниями;
- гипотетический переключатель в РТ, способный модулировать ПТР;

- ГТФазная активность фактора Tu: она чувствительна по меньшей мере к состоянию малой субъединицы рибосомы;
- ГТФазная активность фактора G: восприимчива к типу претранслокационного состояния всей рибосомы.

Современные экспериментальные структурные методы в приложении к такому сложному макромолекулярному комплексу, как рибосома, пока ограничены возможностью наблюдать ее единственное усредненное состояние при криотемпературах, не позволяя увидеть конформационное разнообразие молекулярного комплекса в растворе при естественной температуре, хотя наблюдается значительный прогресс в получении набора состояний при комнатной температуре посредством ЯМР для более простых биологических структур [145]. Поэтому для поиска ответа на поставленные в исследовании вопросы аллостерической регуляции функциональных центров рибосомы был применен метод моделирования молекулярной динамики, речь о котором пойдет ниже.

Глава 3

Результаты и их обсуждение

3.1 Введение

Ранее в обзоре литературы были собраны все опубликованные данные об обмене сигналами между различными функциональными центрами рибосомы. При объединении их в целостную картину оказалось, что многие пути аллостерической регуляции ведут к А-сайту рибосомы — области ПТЦ, где связывается вновь прибывшая aa-тРНК для последующей нуклеофильной атаки аминокислотной группой своего аминокислотного остатка сложноэфирной связи на сложный эфир Р-тРНК с растущим пептидом.

Огромное число экспериментальных данных свидетельствует в пользу аллостерической регулируемости центральной функции рибосомы — синтеза новой пептидной связи в ПТЦ, состоящем из А- и Р-сайтов большой субъединицы рибосомы. Самые многочисленные свидетельства чувствительности ПТЦ к удаленным сигналам относятся ко вновь синтезируемым регуляторным пептидам и антибиотикам, взаимодействующим с верхней частью РТ. Мутагенез и химическое зондирование позволили выявить потенциальных участников передачи сигналов или аллостерических сенсоров из числа остатков рРНК и рибосомных белков, однако, пути и механизмы передачи такого сигнала до сих пор остаются загадкой.

Помимо этого, существует отрицательная обратная связь между А- и Е-сайтами рибосомы: при отсутствии влияния растущего пептида связывание тРНК в одном сайте снижает сродство другого сайта к тРНК. Увеличение длины вновь синтезированного пептида в рибосомном туннеле само по себе способствует диссоциации тРНК из Е-сайта. Таким образом, отрицательные обратные связи соединяют попарно А-

и E-сайты рибосомы, верхнюю часть РТ и E-сайт, а также верхнюю часть РТ (хотя необязательно сайт или способ воздействия эффектора здесь совпадает с предыдущим случаем) и ПТЦ. Учитывая, что воздействие ряда стоп-пептидов поражает в основном способность A-сайта к удержанию тех или иных тРНК [112], логично предположить, что остановка пептидилтрансферазной реакции также связана с ослабленным сродством тРНК к A-сайту и все описанные процессы так или иначе связаны с изменением сродства A-сайта к тРНК.

Таким образом, ключом к пониманию аллостерических процессов в рибосоме, касающихся центральной функции рибосомы — ПТР, может стать антагонизм A- и E-сайтов связывания тРНК. Изменение сродства этих сайтов к тРНК возможно только при существовании как минимум двух стабильных состояний этих сайтов; назовем одно из них, с высоким сродством к тРНК, “открытым”, а противоположное — “закрытым”. Вероятнее всего, “открытое” состояние A-сайта должно способствовать “закрытию” E-сайта, и наоборот. Поэтому первой и самой очевидной задачей стало выявление воспроизводимой конформационной разницы между рибосомой, связавшей A- или E-тРНК.

Аналогичным образом исследовались воздействия на A-сайт других антагонистов разного рода: во-первых, это мутации A2531U и UU2492-3C, известные снижением сродства A-сайта к тРНК, а, во-вторых, связывание антибиотиков эритромицина и хлорамфеникола в РТ (на данном этапе работы — без соответствующих стоп-пептидов).

Для E-сайта также нашлись свои антагонисты: это вновь синтезированные пептиды в РТ длиной от трех аминокислот. Для настоящего исследования были выбраны fMFT и fMRFFR, пребывающие в просвете туннеля, будучи связанными с P-тРНК рибосомного комплекса в посттранслокационном состоянии.

Изучение различных состояний рибосомы и воздействия на них тех или иных лигандов осуществлялось методом молекулярно-динамического моделирования. Молекулярно-динамическое моделирование биополимеров в растворе — распространенный метод изучения динамических характеристик биомолекул и их фрагментов, а также воздействия на эти характеристики мутаций или модификаций отдельных остатков биополимеров, лигандов и других эффекторов. Этот метод заключается в интегрировании уравнений движения системы, в которой атомы биомолекулы представлены как материальные точки с частичным зарядом, ковалентные связи между которыми имитируются набором определенных потенциалов, прописанных в

топологии системы.

Молекулярно-динамическое моделирование многократно и довольно успешно применялось для выявления взаимодействий, что образуют аллостерические сети в биополимерах, как правило, белках и белковых комплексах [146; 147]. Кроме того, полноатомное моделирование МД целой рибосомы или ее субчастиц в ячейке с явным растворителем уже осуществлялось различными исследовательскими группами (подробный обзор этих работ опубликован нами ранее [148]). Значительная часть из этих работ была посвящена изучению транслокации, в ходе которой две тРНК перемещаются по рибосоме из А/А- и Р/Р-сайтов в Р/Р- и Е/Е- через гибридные А/Р- и Р/Е-соответственно. Также изучалась аккомодация тРНК, то есть ее перемещение из А/Т- в А/А-сайт. При этом во всех проведенных исследованиях особое внимание уделялось энергетическим характеристикам взаимодействия тРНК с рибосомой.

В нашей же работе предполагалось получить статичные состояния рибосомы с тРНК в тех или иных сайтах с тем, чтобы выявить тонкие конформационные различия в самой рРНК, когда тРНК связываются в различных сайтах. Помимо этого, конформационный сравнительный анализ также позволяет увидеть отличия во взаимодействиях рибосомы с тРНК в присутствии антагониста соответствующей тРНК и проследить механизм воздействия последнего.

Для расчетов траекторий молекулярной динамики комплексов рибосомы во всех выбранных состояниях были сконструированы соответствующие системы на основе одной структуры из банка данных PDB, чтобы конформационные различия изучаемых систем определялись лишь влиянием тех или иных лигандов и аллостерических факторов. В качестве отправной структуры-родоначальницы была выбрана структура рибосомы *E. coli* с высоким разрешением до 2,9 Å, содержащей Е-, Р- и А/Т-тРНК, полученная методом криоэлектронной микроскопии ([PDB id:5AFI]).

Получение различных состояний из одной исходной структуры соответствует представлению об индуцированном соответствии мишени (в данном случае рибосомы) и лиганда (в нашем исследовании — тРНК). Чтобы обеспечить достаточно плавный процесс достижения взаимного соответствия, не провоцируя диссоциации нового лиганда из рибосомы, была эмпирически подобрана методика оптимизации структуры, включающая ряд коротких расчетов молекулярной динамики с наложением определенных позиционных ограничений на те или иные части системы. Подробно выбранная методика описана в главе “Методы”, подразделе “Моделируемая система” 4.1.

Для максимально точного воспроизведения характеристик системы *in silico* было выбрано одно из самых современных силовых полей — Amber14sb, улучшенные параметры ионов K^+ и Cl^- [149], температура моделирования, соответствующая температурному оптимуму роста *E. coli* и полноатомная модель с явным растворителем — четырехсайтовой модели воды TIP4P_{ew}. Отказ от каких-либо упрощений модели, позволивших бы уменьшить ресурсоемкость расчетов, был нацелен на максимально точное воспроизведение картины водородных связей и других нековалентных взаимодействий конкретных остатков и атомов, которую упрощение топологии макромолекулярного комплекса могло весьма заметно исказить.

Особое внимание по ходу получения результатов моделирования МД было уделено сверке локации найденных переключателей с данными биохимических исследований, футпринтинга, мутагенеза, т. е. с известными экспериментальными фактами о рибосоме. Также подтверждением функциональной важности найденной связи или переключателя считалась консервативность участка либо его согласованное изменение при переходе между царствами бактерий, архей и эукариот.

3.2 Конформация А-сайта большой субъединицы рибосомы при связывании тРНК в А- и Е-сайтах

Как уже было сказано выше, на первом этапе исследования были получены молекулярно-динамические модели рибосомы во взаимно антагонистичных состояниях. Первая содержала в А/А- и Р/Р-тРНК до начала ПТР, вторая же несла на себе Р/Р- и Е/Е-тРНК после полного завершения транслокации. Для этого оба состояния были получены на основе общей исходной структуры 70S рибосомы *E. coli* из банка данных ([PDB id:5AFI]) чередой оптимизаций геометрии системы и коротких расчетов молекулярной динамики с позиционными ограничениями, постепенно взаимно подстраивающими друг ко другу лиганды-тРНК и мишень-рибосому. Таким образом, были получены следующие системы:

- PE — комплекс рибосомы с fMet-P-тРНК^{fMet} и деацелированной E-тРНК^{fMet}
- AP — комплекс рибосомы с Ala-A-тРНК^{Phe} и fMet-P-тРНК^{fMet}

Сокращенные названия “AP” и “PE” будут здесь и далее применяться как для обозначения моделируемых систем с соответствующими тРНК, так и для состояний

рибосомы по ходу элонгационного цикла, связывающей тРНК в указанных позициях.

Рибосому можно представить как макромолекулярную аллостерическую мишень, с которой связываются относительно большие лиганды — тРНК. Для равновесного достижения индуцированного соответствия между столь сложными лигандами и мишенью был применен многоступенчатый протокол оптимизации. Подробно он изложен в главе 4.1 “Методы”, здесь лишь упомянем, что именно этот протокол обеспечил воспроизводимое удержание тРНК с рибосомой без спонтанной диссоциации в последующих расчетах. Для оптимизированных таким образом систем было рассчитано по 4 траектории длиной 200 нс каждая. Как можно судить из графиков эволюции во времени RMSD системы (рис. 3.1, А и В) и потенциальной энергии рибосомы (рис. 3.2, А и В), дрейф системы по поверхности потенциальной энергии заканчивался для этих систем примерно к 100 нс расчета. Поэтому для анализа взаимодействий между отдельными остатками рРНК использовались последние 100 нс каждой из траекторий.

В получившихся стабильных участках траекторий в первую очередь были исследованы взаимодействия между остатками РНК и аминокислот — это водородные связи и стэкинг-взаимодействия плоских ароматических групп. Наличие этих взаимодействий в траектории определялось исходя из геометрических параметров участвующих в них групп (подробнее см. раздел 4.3). Для каждого из выявленных взаимодействий была проведена статистическая оценка его встречаемости его встречаемости как в AP-, так и в PE-состоянии на конечных стабильных участках траекторий.

Конформационные различия между AP- и PE-системами были обнаружены начиная с самого A-сайта большой субъединицы, где CCA-конец A-тРНК удерживается для последующего прохождения ПТР. Он связывается с вершиной спирали H92 23S рРНК, также именуемой A-спиралью: 3'-концевая стопка остатков CCA тРНК встраивается в единую стопку со всей A-спиралью через стэкинг-взаимодействие с U2555 (рис. 3.3). При этом основания G2553 и U2554 удерживают водородными связями C75 и C74 тРНК, соответственно (см. на рис. 3.4, В и табл. 3.1). Помимо этого, A76 формирует водородные связи с G2583, а C75 — с рибозой C2507 вблизи ПТЦ. С противоположной стороны C74 тРНК контактирует своей 2'-гидроксильной группой с C2573.

Фиксация 3'-конца A-тРНК множеством связей с 23S рРНК способствует сближению потенциальных участников ПТР: аминокислоты остатка аланина на A-

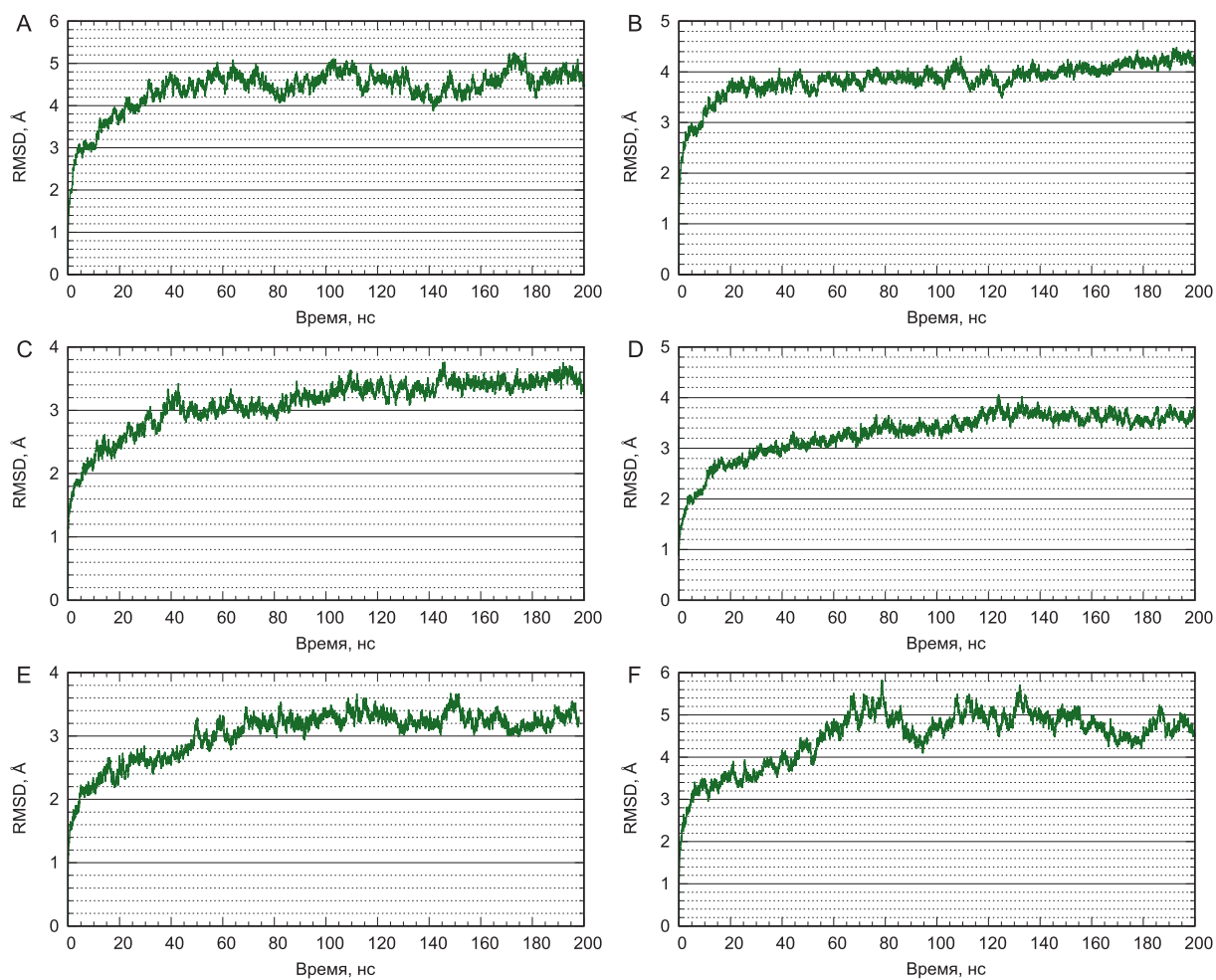


Рис. 3.1. Эволюция RMSD рибосомы в ходе молекулярно-динамического моделирования. **А.** AP-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования. **В.** PE-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования. **С.** AP-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования после 30 циклов оптимизации и короткого расчета МД при 30К. **Д.** PE-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования после 30 циклов оптимизации и короткого расчета МД при 30К. **Е.** AP-состояние с мутацией A2531U. **Ф.** AP-состояние с мутацией UU2492-3C.

тРНК и карбоксильной группы сложного эфира формилметионила и Р-тРНК. Нековалентные взаимодействия 3'-конца А-тРНК фиксируют аминокислотные остатки в положении, близком к последующей нуклеофильной атаке аминогруппы на область образования сложного эфира растущего пептида с тРНК (рис. 3.5). При такой фиксации атомы, должны образовать новую пептидную связь, стабильно удерживаются на расстоянии не более 4Å, что очевидно снижает энтропийную составляющую энергетического барьера для ПТР.

В случае же PE-состояния А-спираль находится в конформации, стерически исключающей связывание ССА-конца тРНК в А-сайте. Во-первых, в PE-состоянии вершина А-спирали из остатков 2553-2556 23S рРНК образует сплошную стопку

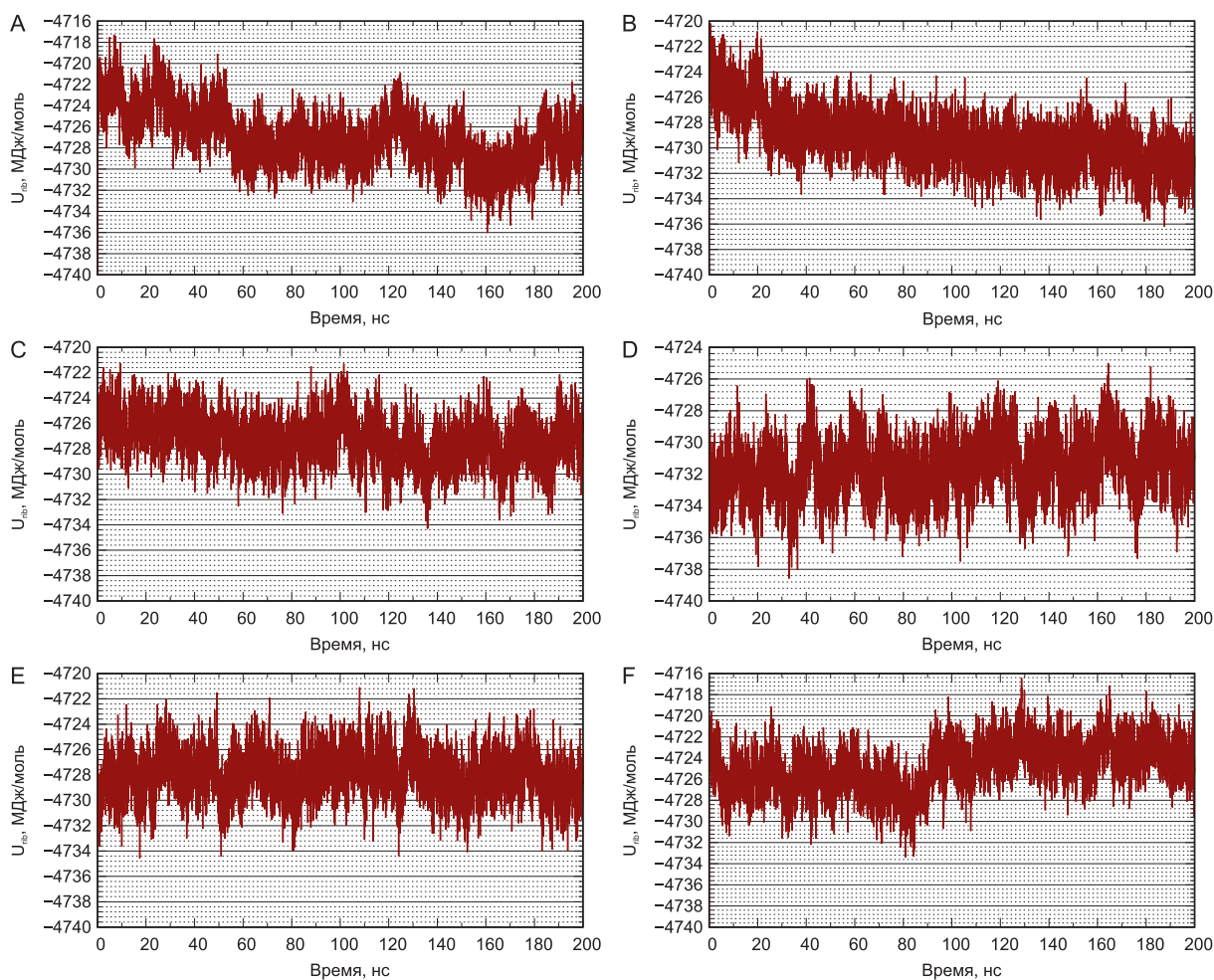


Рис. 3.2. Эволюция потенциальной энергии рибосомы в ходе молекулярно-динамического моделирования. **А.** AP-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования. **В.** PE-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования. **С.** AP-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования после 30 циклов оптимизации и короткого расчета МД при 30К. **Д.** PE-состояние, первый расчет 200 нс молекулярно-динамического моделирования после 30 циклов оптимизации и короткого расчета МД при 30К. **Е.** AP-состояние с мутацией A2531U. **Ф.** AP-состояние с мутацией UU2492-3С.

оснований, так что основание U2554 обязательно вступило бы в стерический конфликт с aa-tРНК (рис. 3.3, В). Кроме того, стерическое противоречие возникло бы еще и с нуклеотидом G2583. И если смещение остатков 2583-2584 под действием А-tРНК уже отмечалось ранее при анализе структурных данных [101], то образование “закрытой” для ССА-конца тРНК в конформации PE-состояния — это то, что было обнаружено только молекулярно-динамическим моделированием.

Таким образом, у нас появляется возможное объяснение способности рибосомы “замораживать” ПТР: вершина А-спирали может закрыться от возможного стэкинг-взаимодействия с ССА-концом А-tРНК, смещая участников потенциальной ПТР от оптимального для катализа взаимного расположения. Следует далее выяснить,

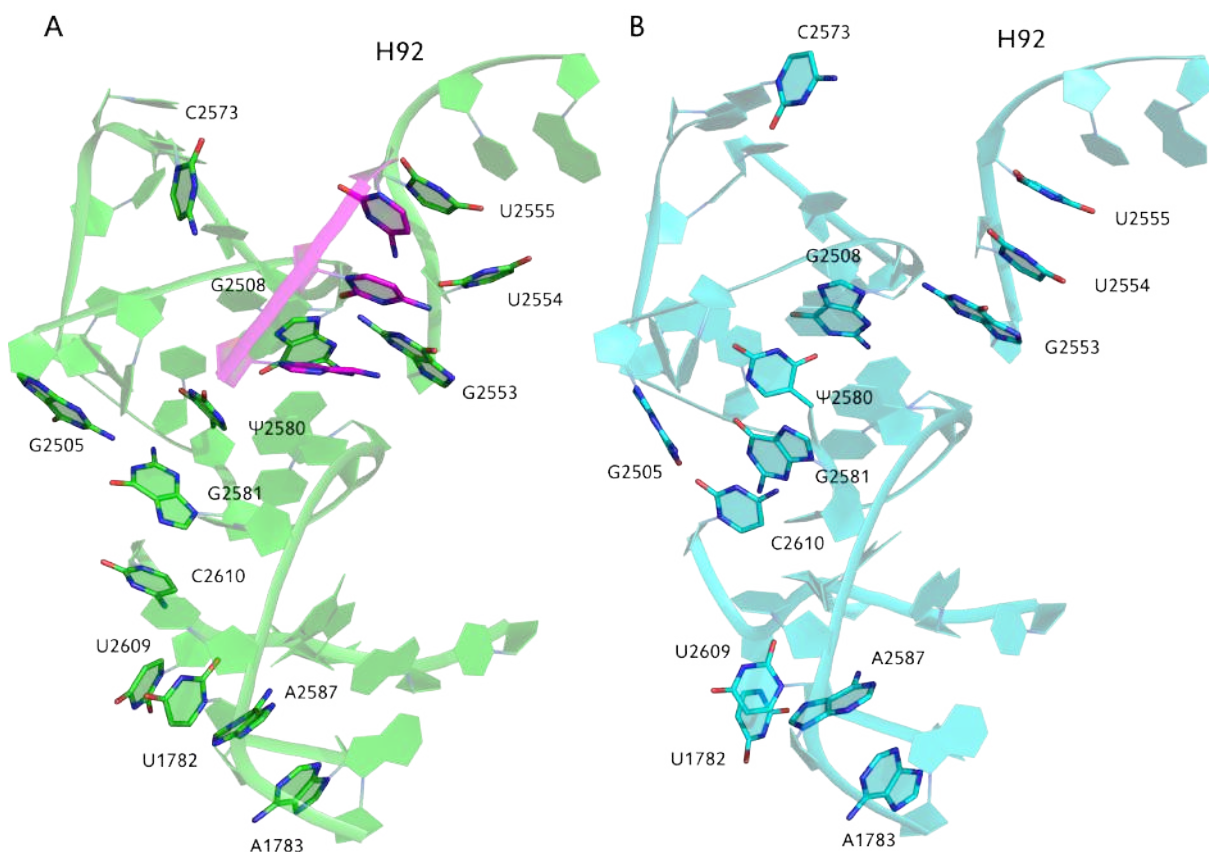


Рис. 3.3. Воздействие 3'-конца тРНК (выделен лиловым цветом) на А-сайт большой субъединицы рибосомы при связывании с ним. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние.

действительно ли это состояние А-спирали аллостерически регулируемо и может ли оно появляться в других состояниях рибосомы, помимо PE-состояния. Этому будут посвящены последующие разделы этой главы, а пока вернемся к рассмотрению изменений, вносимых А-тРНК, на фоне сравнения их с PE-состоянием.

Смещение остатков 2583-2584 приводит к развороту плоскости основания G2581, которое формирует стэкинг-взаимодействия как с соседним остатком Ψ2580, так и с C2610, выходящим в просвет рибосомного туннеля (РТ). Это приводит к значительному перераспределению нековалентных взаимодействий в этой области, которое подробно отображено на рис. 3.4 и в табл. 3.1, раздел “Ψ2580 и его окружение”.

В частности, ближайший к U2554 остаток, также изменяющий свою конформацию — Ψ2580 из спирали H90, на которую опирается вершина А-спирали. Связывание А-тРНК выворачивает его из внутриспирального положения по направлению к РТ, где он формирует водородную связь с G2576, в то время как в PE-состоянии он образует неканоническую пару с G2508 в составе своей спирали (рис. 3.4, А и В и табл. 3.1,

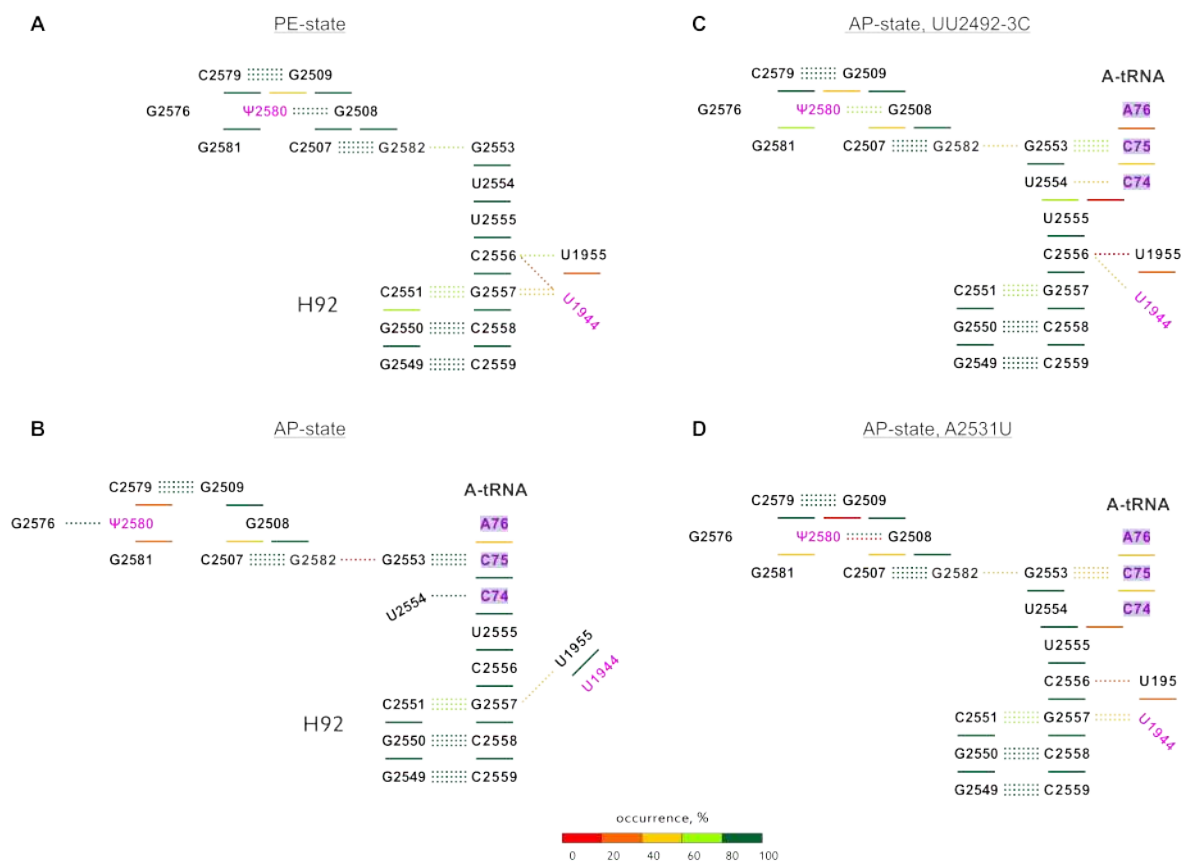


Рис. 3.4. Схема связей 3'-конца А-тРНК с рибосомой. Стэкинг-взаимодействия показаны сплошными горизонтальными линиями, а водородные связи — пунктирными (один пунктир обозначает одну водородную связь). Цвет связи отображает ее среднюю встречаемость по четырем 100 нс конечным участкам траекторий согласно цветовой шкале внизу схемы, от 0-20% до 80-100%. **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние. **С.** Рибосома с мутацией A2531U и А- и Р-тРНК. **Д.** Рибосома с мутацией UU2492-3C и А- и Р-тРНК.

раздел “Ψ2580 и его окружение”). Также в результате этого смещения меняются связи азотистого основания G2505: вместо C2610 в PE-состоянии, в AP-состоянии он взаимодействует с G2581.

Кроме того, разворачиваются два основания U2609 и U1782, находящиеся друг с другом в стэкинг-взаимодействии, так, что они становятся связующим “мостом” между G2581-Ψ2580-C2610 и вершиной спирали H93 (рис. 3.3). Из этой цепи остатки C2610 [114], U2609 [103; 150], U1782 и A2587 из H93 [103] известны как участники передачи сигнала из РТ в ПТЦ при связывании антибиотика в РТ и его взаимодействию с растущей пептидной цепью.

То, что Ψ2580 “выпетливается” из своей спирали, позволяет объяснить незаслуженно подзабытые результаты реульзтаты биохимических экспериментов, полученные еще до разработки первых подробных структурных моделей рибосомы. Более 20 лет назад было показано, что мутация Ψ2580С ведет к резкому, более

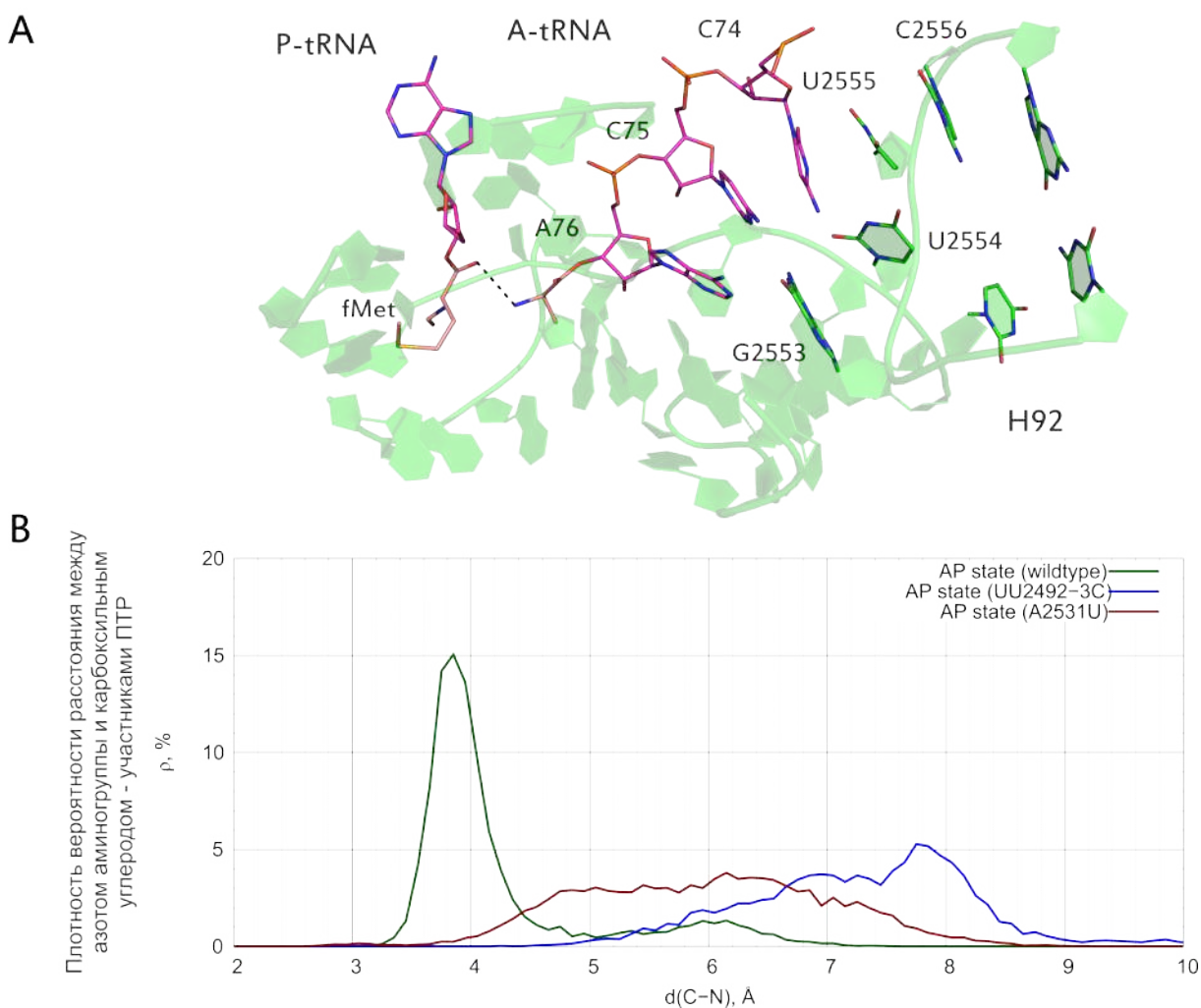


Рис. 3.5. А. Аминоацильный и пептидный фрагмент в ПТЦ в AP-состоянии рибосомы. Водородная связь, наблюдаемая при моделировании МД между потенциальными участниками ПТР, отмечена пунктиром. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). В. Плотность вероятности встречаемости определенной величины расстояния между атомами потенциальной новой пептидной связи в ПТЦ, согласно данным моделирования МД рибосомы в AP-состоянии (зеленая линия), а также рибосомы с А- и Р-тРНК, содержащей мутацию А2531U (бордовая линия) или UU2492-3C (синяя линия).

чем на порядок, снижению эффективности ПТР и заметному уменьшению скорости роста бактериальных клеток [151; 152]. Любопытно, что сами авторы статей 1995-1996 годов объясняли этот эффект возможным взаимодействием остатка 2580 с А-тРНК, еще не располагая сведениями об его нековалентных взаимодействиях. Однако, в свете уже доступных результатов структурных исследований связывания тРНК с рибосомой эффект этой мутации едва ли может быть объяснен: остаток Ψ2580 не образует непосредственных связей с тРНК, а его замена на С даст уотсон-криковскую пару с G2508 внутри H90 без какого-либо изменения геометрии спирали. Так что, если считать внутриспиральные взаимодействия Ψ2580 его

единственными связями, необходимыми для поддержания правильной ориентации А-тРНК в ПТЦ, объяснить столь сильный эффект от мутации решительно невозможно. Однако, если мы посмотрим на его взаимодействия, обнаруженные посредством молекулярно-динамического моделирования, все станет на свои места: его “вывернутое” положение в AP-состоянии рибосомы стабилизируется водородной связью $\Psi_{2580}/N3-N...G_{2576}/N7$. Цитидин же в положении N3 не имеет атома водорода, поэтому не способен образовать аналогичной связи, и AP-состояние в случае этой мутации должно быть намного менее стабильным. Кроме того, чрезмерная стабильность пары остатков 2580 и 2508 (как это было бы в случае мутации) препятствует выгодному для ПТР положению А-тРНК.

С противоположной стороны вершины А-спирали был обнаружен еще один любопытный конформационный переход, обеспечиваемый основаниями U1944 и U1955, “выпетливающимися” из H71. В AP-состоянии они находятся в стэкинг-взаимодействии друг с другом, и U1944 формирует водородную связь с G2557. В PE-состоянии U1944 предпочитает образовывать стэкинг-контакт с изменившим свое положение G2557 вместо прежнего контакта с U1955 (табл. 3.1). Если наложить AP- и PE-состояния А-спирали друг на друга, то видно, что конформация U1944 меняется согласовано с конформацией вершины А-спирали: остаток U1944 при сближении с U1955 вошел бы в стерический конфликт с остатком G2557 А-спирали с изгибом, характерным для PE-состояния (рис. 3.6). Видимо, поэтому, при переходе к эукариотической рибосоме U1944 заменяется на С совместно с заменой G2557 на А (и уотсон-криковской парой к нему, C2551U): рибосоме важно не потерять функционально значимый контакт, участвующий в тонкой перестройке А-спирали при связывании ССА-конца тРНК.

Стабильность полученных AP и PE состояний были проверены на стабильность посредством процедуры, более подробно изложенной в разделе “Методы” 4.1: из объединенных траекторий были извлечены кадры, наиболее близкие к центру наиболее населённого кластера, полученного при кластеризации остатков рРНК в ПТЦ и верхней части РТ; из них, как из новых исходных состояний, были также рассчитаны по четыре траектории, каждая 200 нс длиной. В новых траекториях RMSD также стабилизировался в течение первых 100 нс, а вот потенциальная энергия, в отличие от предыдущих расчетов, менялась слабо, что говорит о достижении системой минимума на суперповерхности потенциальной энергии (рис. 3.1 и 3.2).

В новых полученных траекториях все взаимодействия остатков рРНК в ядре рибосомы — ПТЦ и верхней части РТ — сохранялись в обоих состояниях, поэтому их

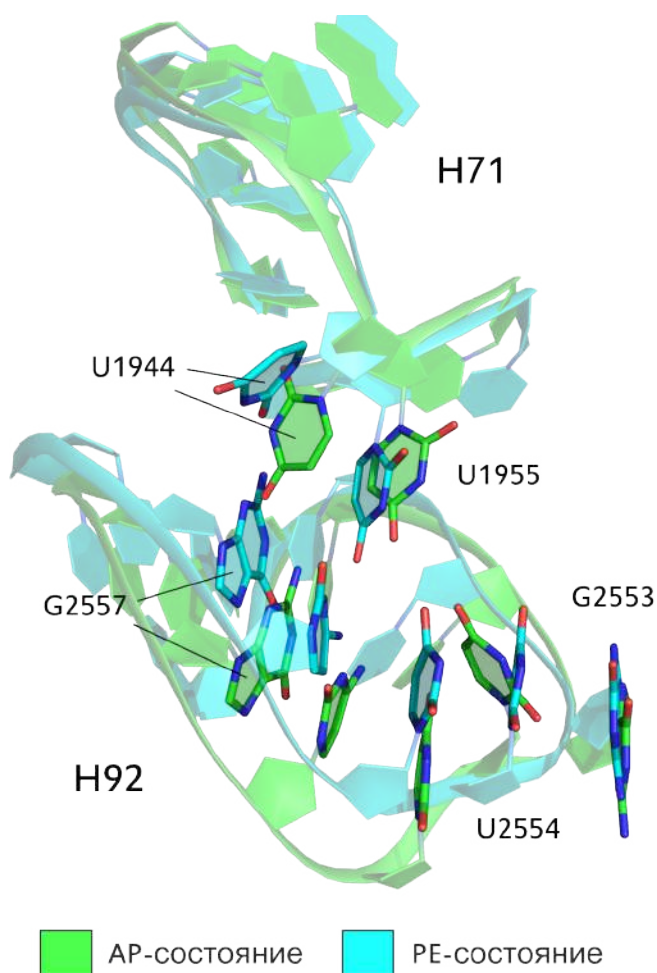


Рис. 3.6. Стерическая несовместимость AP-положения U1944 H71 и PE-положения G2557 А-спирали рибосомы согласно данным молекулярно-динамического моделирования: изгиб А-спирали в PE-состоянии необходимо смещает U1944 H71 из стэкинг-взаимодействия с U1955. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий).

можно считать стабильными и равновесными для выбранных систем.

3.2.1 Малая субъединица рибосомы и ее роль в антагонизме А- и Е-сайтов

В обзоре литературы упоминалась работа, в которой на основании структурных данных рибосомы *H. marismortui* было установлено, что ССА-концы А- и Е-тРНК, связавшись со своими сайтами на большой субъединице рибосомы, никак не влияют на конформацию окружения друг друга [81], из чего можно предположить, что одной большой субъединицы рибосомы недостаточно для формирования аллостерической взаимосвязи А- и Е-сайтов.

И действительно, воспроизводимые конформационные различия между AP-

Таблица 3.1. Встречаемости нековалентных взаимодействий в моделировании МД для АР и РЕ систем. **АР (МД1)** и **РЕ (МД1)** — первое моделирование систем с рибосомой в АР и РЕ состоянии, соответственно; **АР (МД2)** и **РЕ (МД2)** — моделирование систем, полученные из результатов предыдущего расчета после дополнительной оптимизации (см. раздел “Методы” 4.1). Значения рассчитаны по 4-м независимым траекториям для каждой системы и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Взаимодействие	АР (МД1)	АР (МД2)	РЕ (МД1)	РЕ (МД2)
А-сайт				
U2554 U2555	11 \pm 19	7 \pm 14	86 \pm 2	68 \pm 28
G2553 U2554	4 \pm 2	0 \pm 0	93 \pm 7	96 \pm 3
(A-tRNA)C74 U2555	98 \pm 1	87 \pm 23	0 \pm 0	0 \pm 0
(A-tRNA)C75/N4-H...G2553/O6	95 \pm 2	92 \pm 4	0 \pm 0	0 \pm 0
G2553/N2-H...(A-tRNA)C75/O2	87 \pm 15	81 \pm 17	0 \pm 0	0 \pm 0
(A-tRNA)C74/N4-H...U2554/O2	70 \pm 47	95 \pm 2	0 \pm 0	0 \pm 0
U1944 U1955	86 \pm 19	86 \pm 10	25 \pm 29	29 \pm 34
G2557/N2-H...U1944/O4	67 \pm 54	72 \pm 48	0 \pm 0	0 \pm 0
Ψ 2580 и его окружение				
Ψ 2580/N1-H...G2582/O6	35 \pm 15	32 \pm 23	0 \pm 0	0 \pm 0
Ψ 2580/N3-H...G2576/N7	35 \pm 18	45 \pm 23	0 \pm 0	0 \pm 0
Ψ 2580/N3-H...G2508/O6	0 \pm 0	0 \pm 0	70 \pm 26	86 \pm 15
G2508/N1-H... Ψ 2580/O4	0 \pm 0	0 \pm 0	92 \pm 5	98.3 \pm 0.7
G2505/N2-H...C2610/N3	2 \pm 3	0 \pm 0	33 \pm 21	33 \pm 26
G2505/N1-H...C2610/O2	0 \pm 0	0.8 \pm 1.5	23 \pm 18	28 \pm 39
G2505/N2-H...G2581/O6	32 \pm 23	53 \pm 20	4 \pm 4	9 \pm 13
H93 и ее окружение				
C1941 C1965	99.0 \pm 0.9	98.7 \pm 0.5	0 \pm 0	3 \pm 7
C1941 C1942	80 \pm 15	89 \pm 7	0.5 \pm 0.6	0.1 \pm 0.2
C2591 G2592	0 \pm 0	0 \pm 0	89 \pm 10	66 \pm 45
C2591/N4-H...G2603/O6	1 \pm 3	1 \pm 2	99 \pm 1	94 \pm 12
G2603/N2-H...C2591/O2	0 \pm 0	0 \pm 0	99 \pm 1	95 \pm 5
Мост B7a				
A1848 a702	3 \pm 6	0.1 \pm 0.2	54 \pm 2	51 \pm 20
A1847 A1848	51 \pm 8	45 \pm 10	0 \pm 0	5 \pm 8
a702/N6-H...C1894/O2	0 \pm 0	5 \pm 8	20 \pm 18	19 \pm 19
Мост B2a/d				
A1919/O2'-H...g1517/N3	44 \pm 31	45 \pm 44	0 \pm 0	6 \pm 1
g791/N2-H...g1517/O6	0 \pm 0	0 \pm 0	96 \pm 2	90 \pm 7
g1517/N2-H...c1496/O2	22 \pm 30	2 \pm 4	79 \pm 22	83 \pm 16
g1497/N2-H...m ⁶ ₂ a1519/N3	23 \pm 27	0 \pm 0	92 \pm 5	85 \pm 5
a1499 m ⁶ ₂ a1519	56 \pm 30	43 \pm 10	19 \pm 3	3 \pm 3
Мост B3				
C1958 G1959	97 \pm 4	96 \pm 2	12 \pm 12	0.1 \pm 0.1
G1959/N2-H...a1483/N3	95 \pm 6	96 \pm 2	26 \pm 23	16 \pm 23
C1957/N4-H...G1949/O6	81 \pm 23	66 \pm 30	0 \pm 0	0 \pm 0
G1949/N1-H...C1957/N3	79 \pm 38	65 \pm 38	0 \pm 0	0 \pm 0

и РЕ-состояниями были обнаружены нами как в малой субъединице, так и в зоне нековалентных контактов малой субъединицы с большой — так называемых

межсубъединичных мостах.

С малой субъединицей рибосомы А-тРНК контактирует своей антикодоновой петлей, которая, помимо связей с мРНК, образует водородные связи с остатками G530 и AA1492-3, “выпетливающимися” из h18 и h44, соответственно, а также формирует общую стопку с основаниями U1054 и A1196 спирали h34 16S рРНК.

Антикодоновая петля Е-тРНК связывается преимущественно с мРНК, как минимум с двумя из трех оснований кодона образуя стабильные пары. Это воздействие несколько смещает прилежащую спираль h23 и стабилизирует ее. Эта спираль с противоположного от мРНК конца образует межсубъединичный мост В7а: A702 h23 16S рРНК формирует стэкинг-взаимодействие с A1848 23S рРНК на характерном “изломе” спирали H68 23S рРНК. Как оказалось, этот мост, наблюдаемый в любых структурах рибосомы при криотемпературах, при моделировании молекулярной динамики стабилен исключительно в РЕ-состоянии. В АР-состоянии обрзующие его межсубъединичные связи полностью расходятся, а спираль H68 закрывается для взаимодействия с A702 16S рРНК через образование стэкинга между A1847 и A1848 (рис. 3.7 и табл. 3.4).

Разобшение моста В7а в АР-состоянии и его стабильность в РЕ-состоянии при нормальной для рибосомы температуре подтверждаются экспериментальными данными группы Динмана, полученными при исследовании подвижности остатков рРНК рибосом *Saccharomyces cerevisiae* в различных функциональных состояниях методом hSHAPE (высокопроизводительного селективного ацилирования 2'-гидроксила рибозы с достройкой праймера, high-throughput Selective 2'-Hydroxyl Acylation by Primer Extension) [153]. Согласно этим данным, только в каноническом РЕ-состоянии (или пост-транслокационной рибосоме) остатки 913-915 18S rRNA (соответствующие 702-704 16S rRNA *E. coli*) и U2205 25S rRNA (формирующий стэкинг-взаимодействие с G913 18S rRNA) защищены от воздействия реагента, в то время как в АР-состоянии (пост-аккомодационное состояние, фиксированное антибиотиком циклогексимином), как и в других функциональных состояниях эти остатки обладали значительной реакционной способностью, свидетельствующей о нарушении стэкинг-взаимодействия связующих оснований моста В7а.

Как и с “выпетливанием” Ψ2580, при внимательном изучении уже известных, но не привлекавших ранее внимания исследователей экспериментальных данных мы обнаружили подтверждение фактам, наблюдаемым исключительно в динамической модели рибосомы и отсутствующих в ее структурах при криотемпературах.

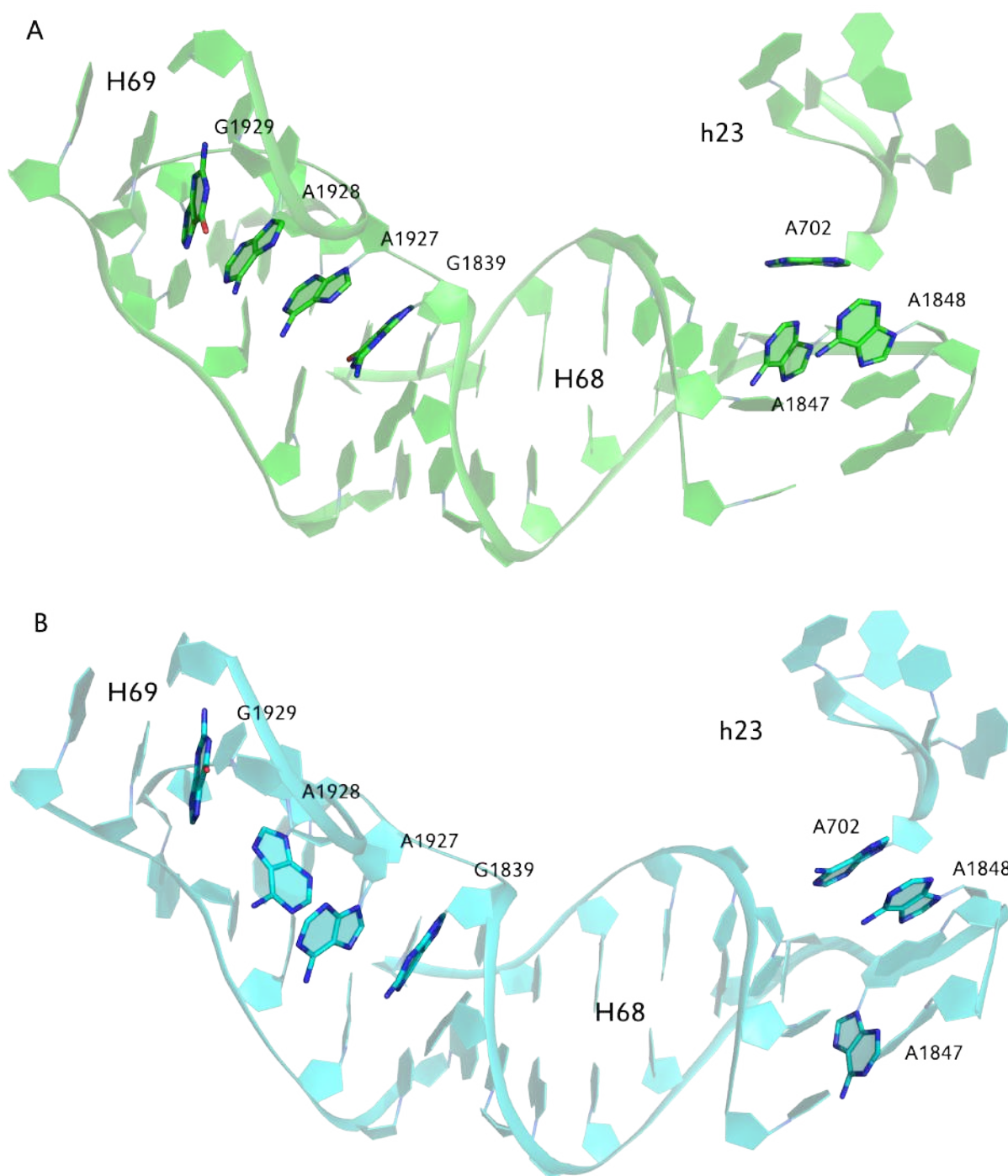


Рис. 3.7. Разрушение межсубъединичного моста В7а в районе связывания Е-тРНК, наблюдаемое в ходе моделирования МД АР-состояния рибосомы. Его стабилизация посредством Е-тРНК приводит к расхождению взаимодействий, соединявших в АР-состоянии спирали Н68 и Н69, последняя из которых образует межсубъединичным мост В2а/d недалеко рядом с ДЦ. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** АР-состояние. **В.** РЕ-состояние.

Воздействие антикодоновой петли А-тРНК на малую субъединицу рибосомы наиболее ярко проявляется в конформационных изменениях, происходящих в непосредственной близости от другого межсубъединичного моста с номером В2а/d [90]. Этот мост также является структурным элементом декодирующего

центра, сокращенно ДЦ, где происходит отбор антикодонов приходящей тРНК на соответствие кодону мРНК. В этом процессе большую роль играют взаимодействия кодон-антикодоновой пары с G530 и AA1492-3 рРНК (см. обзор литературы, подраздел “Аллостерическая регуляция декодирования и отбора антикодона тРНК”). В свете изучения дальнедействующих эффектов от связывания А-тРНК важно обратить внимание на смещение образующей данный мост спирали H69 23S рРНК и ее связей внутри моста с h44 16S рРНК (табл. 3.4, раздел “Мост В2а/d”).

Кроме того, некоторые перегруппировки взаимодействий происходят и в межсубъединичном мосте В3 (табл. 3.4, раздел “Мост В3”).

Сведения об основных остатках, участвующих в перераспределении нековалентных взаимодействий в рибосоме собраны в таблицу 3.2, к которой мы еще будем возвращаться по ходу повествования при обсуждении других состояний рибосомы.

3.3 Связывание тРНК в E-сайте 50S субъединицы рибосомы

E-тРНК связывается с большой субъединицей рибосомы в P/P,E/E-состоянии одновременно в нескольких локусах (рис. 3.8). Рассмотрим их по порядку, начиная с самого конца тРНК.

- Конечный остаток A76 акцепторного стебля деацелированной E-тРНК встраивается в карман, образуемый азотистыми основаниями остатков G2421 и C2422, образуя водородные связи с противостоящим остатком C2394. Это происходит в квазиспиральной структуре, прилежащей к H88, в которую A76 встраивается как недостающая пара для G2394.
- Следующее основание тРНК — C75 — присоединяется к стопке из четырех универсально консервативных аденинов — остатков A2432, A2433, A199 и A2424 23S рРНК — через стэкинг-взаимодействие с A2432. Эта адениновая стопка образует связь с еще одним универсально консервативным элементом — переходом между спиралями H74 и H75, куда также примыкает вершина H93.
- Локоть E-тРНК через стэкинг-взаимодействия удерживается азотистыми основаниями протуберанца L1: G2112 и G2168 фиксируют остатки G20 и C57 E-тРНК, образуя стопки G20-G2112-U2113-A2114-G2115 и C57-G2168-A2169-A2170,

Таблица 3.2. Перераспределение нековалентных взаимодействий в рибосоме при смене ее функционального состояния согласно данным молекулярно-динамического моделирования. Трехточие обозначение образование одной или нескольких водородных связей с остатком из первого столбца, двойная вертикальная черта || – стэкинг-взаимодействие. Прописными буквами указаны названия остатков 23S рРНК, строчными – 16S рРНК. **АР–состояние** – рибосома дикого типа с А/А– и Р/Р–тРНК. **Мутации** – рибосомы с тем же набором тРНК с мутацией UU2492-3С или А2531U. **РЕ–состояние** – рибосома дикого типа с fMet-Р/Р– и Е/Е–тРНК. **Пептиды в РТ** – рибосома с пептидил-Р/Р и Е/Е–тРНК, с последовательностью пептидилных фрагментов fMFT или fMRFFR.

Остаток	АР–состояние	Мутации	Пептиды в РТ	РЕ–состояние
U2554	C74 (тРНК)	U2555	U2555	U2555
Ψ2580	...G2582	...G2508	...G2508	...G2508
G2505	...G2581	...G2581, ...C2610	...C2610	...C2610
U1944	U1955, ...G2557	U1955	U1955, G2557	G2557
(H93) G2592	...A1966	G2591	...A1966	G2591
G2603	C2601	...C2591	C2601, ...C2591	...C2591
(H93) G2588	...C2606 (H93)	...C2606 (H93)	...C2606 (H93)	A1785 (H65)
(H65) A1786	...G1770 (H65)	A1938 (H93)	...G1770 (H65)	A1938 (H93)
C1941	A1965	дестаб. A1965	A1965	-
A1937	...G1964 (H70)	...C1934 (H70)	...G1964 (H70)	...C1934 (H70)
(H65) A1783	A2587 (H93)	G2588 (H93)	A2587 (H93)	G2588 (H93)
(H65) A1785	...U1778 (H65)	...U1778 (H65)	...U1778 (H65)	...G2588 (H93)
(H68) A1848	A1847 (H68)	a702 (h23)	a702 (h23)	a702 (h23)
(h45) g1517	...u1406 (h44)	...u1406 (h44)	...c1496 (h44)	...c1496 (h44), ...g791 (h24)
(h45) m ⁶ ₂ a1519	a1499 (h44)	...g1497 (h44)	...g1497 (h44)	...g1497 (h44)
(H71) G1959	...a1483 (h44), C1958	...a1483 (h44), C1958	...a1483 (h44), C1958	-
(h44) a1483	...G1959 (H71)	...G1959 (H71)	...G1959 (H71)	...g1417 (h44)
(H74) U2074	C2073	C2073	C2073	...G2597 (H93)
(H75) G2238	...G2242, ...U2079	...A2241/...G2242	...G2242, ...U2079	...A2241

соответственно. Эти стопки формируются исключительно в ходе молекулярно-динамического моделирования, едва угадываясь в исходных структурных данных. Связывание Е–тРНК вершиной протуберанца сопровождается формированием в этой вершине водородной связи U2167 и А2170 вместо стэкинг-взаимодействия первого основания с U2166 в АР–состоянии (табл. 3.3, раздел “L1 протуберанец”).

- Наконец, весьма умеренные по встречаемости, но воспроизводимые водородные связи самого протяженного стебля H68 с акцепторным стеблем тРНК в области

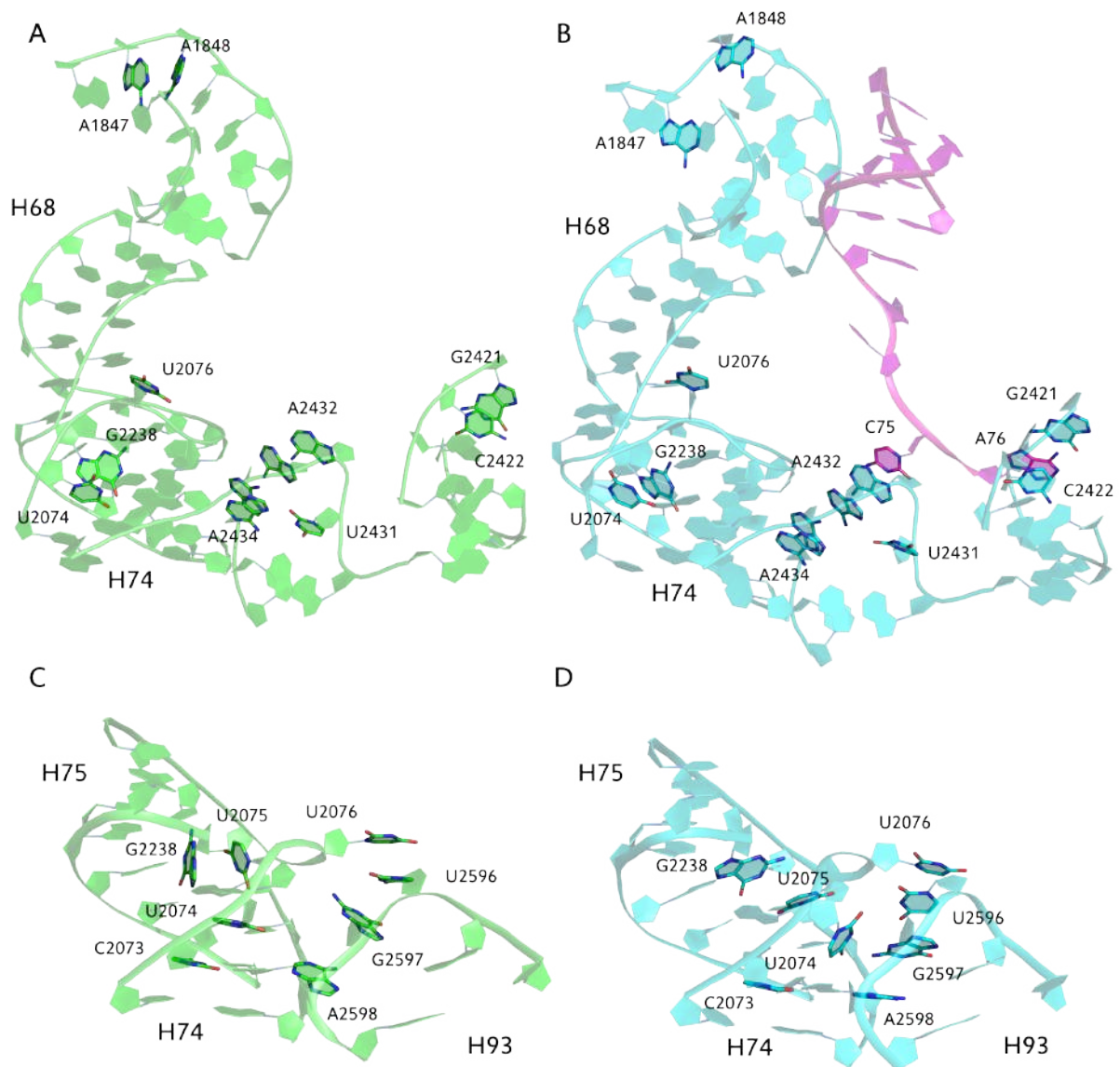


Рис. 3.8. Воздействие акцепторного стебля тРНК (выделен лиловым цветом) на Е-сайт большой субъединицы рибосомы при связывании с ним. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние. **С.** AP-состояние, район соединения H74, H75 и H93. **Д.** PE-состояние, район соединения H74, H75 и H93.

оснований 72-73 тРНК (табл. 3.4, раздел “H68 и мост В7а”) образуются в результате связывания Е-тРНК со своим каноническим сайтом. Этот сайт контакта акцепторного стебля находится в спирали H68, которая ведет непосредственно к межсубъединичному мосту В7а и который уже упоминался ранее: этот межсубъединичный контакт стабилен только в рибосоме с тРНК в каноническом Р/Р,Е/Е-сайте.

При этом, когда Е-тРНК занимает свою своей многосайтовую позицию на большой субъединице рибосомы, а межсубъединичный мост В7а замыкается, а в структуре

А-сайта происходят значительные изменения, без преодоления которых связывание тРНК в последнем было бы затруднительно. Коротко перечислим их, поскольку многие изменения мы уже упоминали при детальном рассмотрении А-сайта:

- Вершина А-спирали формирует сплошную стопку оснований G2553-U2554-U2555, что несовместимо со встраиванием ССА-конца А-тРНК через стэкинг-взаимодействие с U2555.
- Ψ 2580 оказывается внутри спирали, взаимодействуя с G2508.
- Стопка A751-A752-A1781-U1780 в РТ не расходится благодаря отсутствию смещения C2610, U2609 и U1782, вызываемого связыванием А-тРНК и “разворотом” Ψ 2580.
- Универсально консервативное основание A2062 “выворачивается” так, что не оставляет места для связывания ССА-конца тРНК в А-сайте, слабо взаимодействуя при этом с G2553.

Далее мы попытались выяснить, как состояние А-сайта связано с сайтами связывания Е-тРНК, и какие локусы связывания преимущественно модулируют А-сайт. Поэтому рибосома была представлена как граф связей между вершинами — остатками рРНК (почему именно рРНК, подробнее разобрано в главе “Методы” 4.3). Пути между сайтами связывания Е- и А-тРНК были проанализированы на предмет конформационных изменений, характеристик подвижности остатков, корреляций энергий взаимодействия между остатками. Результаты этого этапа исследования изложены в следующей главе.

3.4 Взаимодействие А- и Е- сайтов рибосомы

В предыдущих главах мы подробно изложили изменения в структуре рРНК, непосредственно вызываемые связыванием А- и Е-тРНК. Многие из этих изменений были впервые обнаружены при молекулярно-динамическом моделировании, и при этом подтверждаются известными экспериментальными данными. Это неудивительно, ведь моделирование при 310К (температурном оптимуме *E. coli*) учитывает энтропийный фактор, который смещает распределение конформаций, делая выгодными те из них, что были не видны при криотемпературах.

Таблица 3.3. Встречаемости нековалентных взаимодействий в E-тРНК и E-сайта рибосомы в данных молекулярно-динамического моделирования. Значения рассчитаны по 4-м независимым траекториям для каждой системы и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Взаимодействие	AP- состояние	PE- fMFT	PE- fMRFFR	PE- состояние
Внутренние связи E-тРНК				
A47/N6-H...G23/O6	0 \pm 0	0 \pm 0	33 \pm 39	88 \pm 16
A39/N6-H...C33/N3	0 \pm 0	0 \pm 0	24 \pm 12	43 \pm 33
A14/N6-H...A22/N3	0 \pm 0	10 \pm 11	7 \pm 10	57 \pm 17
U61/N3-H...G19/O3'	0 \pm 0	26 \pm 31	41 \pm 49	95.6 \pm 0.8
Ψ 56/N3-H...A59/O2P	0 \pm 0	0 \pm 0	2 \pm 5	98.8 \pm 0.3
G23/N1-H...C13/O2	0 \pm 0	3 \pm 1	9 \pm 9	79 \pm 27
Ψ 56/O2'-H...A58/N7	0 \pm 0	6 \pm 12	20 \pm 27	98.1 \pm 0.9
G20/N2-H...C57/O2	0 \pm 0	37 \pm 26	63 \pm 22	98.6 \pm 0.5
C57/N4-H...G20/O6	0 \pm 0	2 \pm 4	33 \pm 40	98.0 \pm 0.5
G20/N1-H...C57/N3	0 \pm 0	17 \pm 29	56 \pm 40	95 \pm 3
Связи E-тРНК с 23S рРНК				
C2394/N4-H...(tRNA)A76/O2'	0 \pm 0	40 \pm 47	14 \pm 18	69 \pm 13
C2394/N4-H...(tRNA)A76/N3	0 \pm 0	0.1 \pm 0.2	13 \pm 15	31 \pm 10
(tRNA)G2/N2-H...U1852/O1P	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	99.2 \pm 0.4
G1891/N2-H...(tRNA)A73/O1P	0 \pm 0	6 \pm 12	0 \pm 0	35 \pm 26
G1891/N2-H...(tRNA)C72/O2'	0 \pm 0	9 \pm 10	0 \pm 0	40 \pm 27
Узел между H93, H74 и H75				
G2597/N2-H...U2074/O4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	62 \pm 31
U2074/N3-H...G2597/N3	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	36 \pm 14
C2073 U2074	99.4 \pm 0.3	43 \pm 23	35 \pm 38	0 \pm 0
A2241/N6-H...G2238/N7	0 \pm 0	32 \pm 37	0 \pm 0	82 \pm 10
G2238/N2-H...U2079/O4	84 \pm 13	40 \pm 46	84 \pm 4	0 \pm 0
G2238/N1-H...G2242/O6	88 \pm 6	42 \pm 49	96 \pm 2	0 \pm 0
U2245/N3-H...A2435/N7	2 \pm 3	26 \pm 33	5 \pm 6	52 \pm 40
U2245/N3-H...G2436/N7	88 \pm 16	49 \pm 50	56 \pm 38	9 \pm 14
U2244/N3-H...A2077/N1	0 \pm 0	0 \pm 0	7 \pm 12	41 \pm 30
U2243/N3-H...A2077/N1	98 \pm 1	96 \pm 2	45 \pm 52	32 \pm 37
L1 протуберанец				
(tRNA)G20/N2-H...(tRNA)C57/O2	0 \pm 0	37 \pm 26	63 \pm 22	98.6 \pm 0.5
(tRNA)C57/N4-H...(tRNA)G20/O6	0 \pm 0	2 \pm 4	33 \pm 40	98.0 \pm 0.5
(tRNA)G20/N1-H...(tRNA)C57/N3	0 \pm 0	17 \pm 29	56 \pm 40	95 \pm 3
A2176/N6-H...U2122/O4	10 \pm 17	92 \pm 6	90 \pm 10	77 \pm 14
G2116/N1-H...A2171/N1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	98 \pm 2
U2167/N3-H...A2170/N7	0 \pm 0	76 \pm 35	0 \pm 0	72 \pm 30
U2166 U2167	77 \pm 9	50 \pm 26	45 \pm 12	13 \pm 11
A2170 A2171	11 \pm 22	0 \pm 0	0 \pm 0	57 \pm 2
A2171/N6-H...G2116/O6	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	96 \pm 4
A2170/N6-H...U2166/O4	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	91 \pm 7

Вероятно, для отрицательной обратной связи между средством A- и E-сайтов к тРНК найдется объяснение в наблюдаемых структурных изменениях динамической

модели.

Изучение полного графа взаимодействий между остатками рРНК, а также конформационных различий на путях в этом графе позволило выдвинуть наиболее вероятного кандидата на передающий аллостерический сигнал элемент — это спираль Н93, связующая сайт прикрепления С75 Е-тРНК и А-спираль. Именно Н93 подвергается самым значительным изменениям в положении, структуре и внутренних и внешних связях при переходе от АР- к РЕ-состоянию.

Как уже было сказано, С75 Е-тРНК примерно на 3Å смещает стопку универсально консервативных аденинов А2432-А199-А2433-А2434, т.е. перемещает каждый из нуклеотидных остатков примерно на бывшую позицию соседа. Это значительно искажает структуру, к которой стопка непосредственно прикреплена: универсально консервативный участок перехода между спиральями Н74 и Н75 с тройками компланарных оснований, к которым дополнительно примыкает вершина Н93. Вершина Н93 представлена здесь стопкой остатков U2596-G2597-A2598, которую завершает “вышетливающееся” на стыке спиралей Н74/Н75 основание U2076.

Вся эта сложная структура претерпевает различные внутренние относительные сдвиги при существенном смещении сочлененной с нею стопки из четырех консервативных аденинов, на которую воздействует С75 Е-тРНК. В результате, U2074 выходит из спиральной структуры и образует пару с G2597 из вершины Н93. При этом прилежащие два остатка, G2238 и U2075, разворачиваются примерно на 90° (рис. 3.8). Также есть и другие искажения Н74/Н75, реализованные в изменениях внутриспиральных связей (табл. 3.3, раздел “Узел между Н93, Н74 и Н75”), однако, наибольшему воздействию подверглась именно спираль Н93.

У спирали Н93 сильно отличается конформация в различных состояниях рибосомы: в АР состоянии она несколько искажена в центре (нарушаются стэкинг-взаимодействие между G2592 и C2591, а также внутренние водородные связи спирали), в РЕ этого искажения нет. От этой спирали отходят различные короткие стопки внеспиральных оснований, причем в различных состояниях Н93 поддерживает связь с разными из них. Так, универсально консервативная стопка А1966-С1965-С1941-С1942-У1943 во внутренней петле, соединяющей Н71 с Н67 и Н69, связана с Н93 и сохраняет все свои внутренние стэкинг-взаимодействия только в АР-состоянии, в РЕ-состоянии она разобщена в районе С1941 (рис. 3.9).

Основания U1944 и U1955, формирующие стабильную стопку лишь в АР-состоянии, также выступают из однотяжевого участка рядом с Н71. Положение

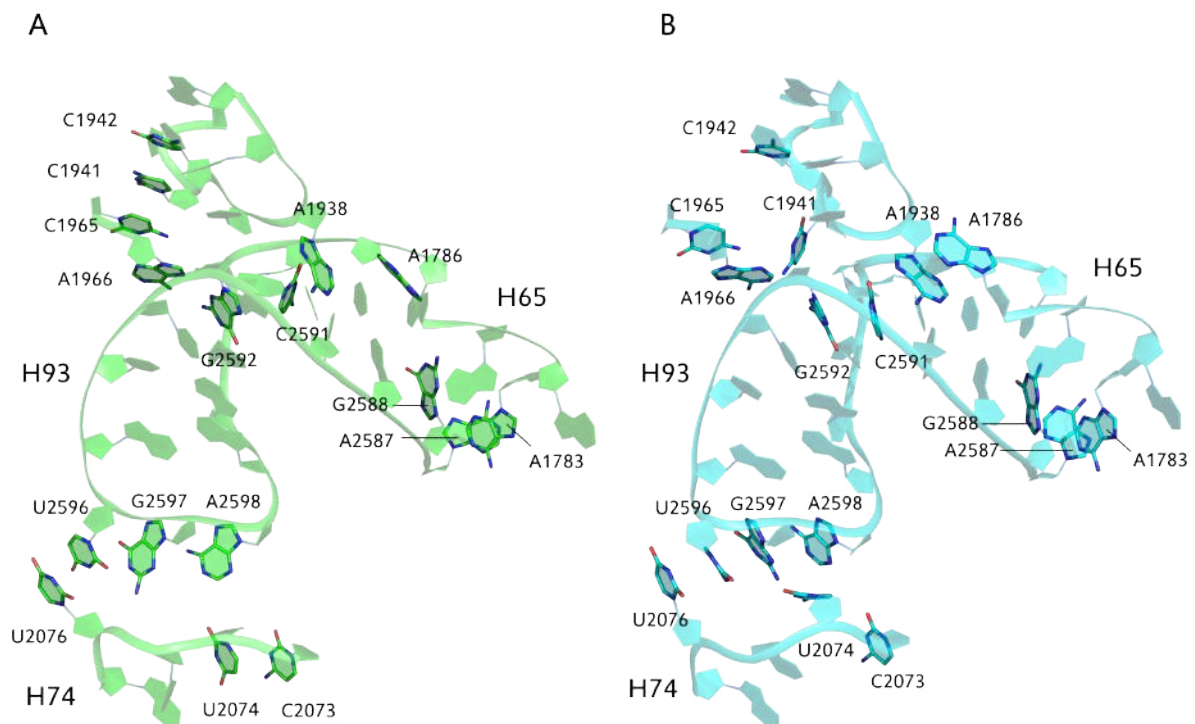


Рис. 3.9. Различия в конформации и внешних связях спирали Н93, напрямую соединяющей сайт связывания С75 Е-тРНК и ПТЦ, наблюдаемые в молекулярно-динамическом моделировании AP- и PE-состояний рибосомы. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние.

U1944 значительно изменяется при расхождении стопки A1966-C1965-C1941-C1942-U1943, делая возможным тот изгиб А-спирали, при котором основание его вершины выстроены в общую стопку G2553-U2554-U2555. В том положении, в котором U1944 был фиксирован в AP-состоянии, он бы вступил в стерический конфликт с остатками 2556-2557 23S рРНК (рис. 3.6). При этом вторая половина стебля Н71 и основания A1952 и A1953, связывающиеся с А-спиралью в месте ее срединного изгиба, практически не меняют своего положения, если структуру 23S рРНК выровнять по спиральям предполагаемой “проторибосомы” (см. раздел литературного обзора “Минимальная рибосома” 2.1.3).

Кроме того, только в PE-состоянии Н93 поддерживает связь со стопкой из пары оснований m⁵U1939 и A1937, разрывая связь с A1938, благодаря чему последний возвращался в состояние стэкинг-взаимодействия с A1786 из вершины Н65. Мы уже упоминали элементы этой спирали, когда говорили про образование новой структуры рядом с ПТЦ, начиная с Ψ2580: в ней участвовали основания U1782 и A1783 также из вершины Н65 (рис. 3.9). Упрочнение же связей со стопкой из m⁵U1939 и A1937 отодвигает последнее основание, A1937, от спирали Н70, разрывая его связи с G1964,

стабильные только в AP-состоянии.

Интересно и то, что универсально консервативное основание A2602, находящееся между CCA-концами A- и P-тРНК в ПТЦ, выпетливается как раз из H93. Искажения, вносимые в H93 посредством связывания E-тРНК, смещают A2602 так, что он слабо взаимодействует с G2553, экранируя эту позицию для C75 A-тРНК. Однако, в H71 остатки 1954-1958 ее вершины смещаются из своих позиций в спирали, разрывая ее внутренние связи.

Тонкая подстройка конформации вершины A-спирали, таким образом, осуществляется внеспиральными консервативными элементами H93, конформационное состояние которых зависит от положения самой спирали. Эти элементы регулируют состояние A-сайта как минимум с двух сторон: со стороны малой субъединицы через U1944 и со стороны рибосомного туннеля через Ψ 2580.

Помимо множества изменений в H93, удается найти и не менее важный “второй контур” этой системы передачи изменения конформационного состояния: это спирали H68-71, которые, кроме H69, ответвляющейся к мосту B2a/d, соединяют общим извилистым стеблем H75, мост B7a, короткие перемычки из стопок оснований, отходящих от H93, и, наконец A-спираль. Последнюю с H71 связывает два непосредственных контакта: один из них — гибкий и чувствительный к состоянию H93 контакт с U1944 и U1955, а второй — неизменно стабильные взаимодействия с A1952 и A1953.

Этот стебель напрямую соединяет мосты B7a и B2a/d. Внедрение A702 16S рРНК в H68 требует выпадения основания A1847 из спирали H68, поэтому образование моста B7a сдвигает весь стебель H68 по направлению от A-сайта примерно на 1 Å. При этом смещении стопка оснований G1839-A1927-A1928-G1929, соединяющая спирали H68 и H69, оказывается разорванной (рис. 3.7). В противоположном случае, в AP-состоянии, связывание A-тРНК “прижимает” H69 к H68, чем уплотняет структуру последней, вынуждая A1847 находиться в стэкинге с A1848 и тем самым не оставляя места для внедрения A702 16S рРНК.

Через малую субъединицу рибосомы также существует путь сообщения между мостами, состояние которого изменяется под действием тРНК: стопка остатков 1517-1519 ближайшей к 3'-концу 16S рРНК шпильки h45 встраивается в район между h44 и h45 посредством стэкинг-взаимодействия m^6_2 A1519 и A1499; в PE-состоянии связи в области h44 оказываются незатронутыми, а G1517 скрепляет собой h24 и h44 через образование водородных связей с G791 и C1496, соответственно (табл. 3.4, раздел

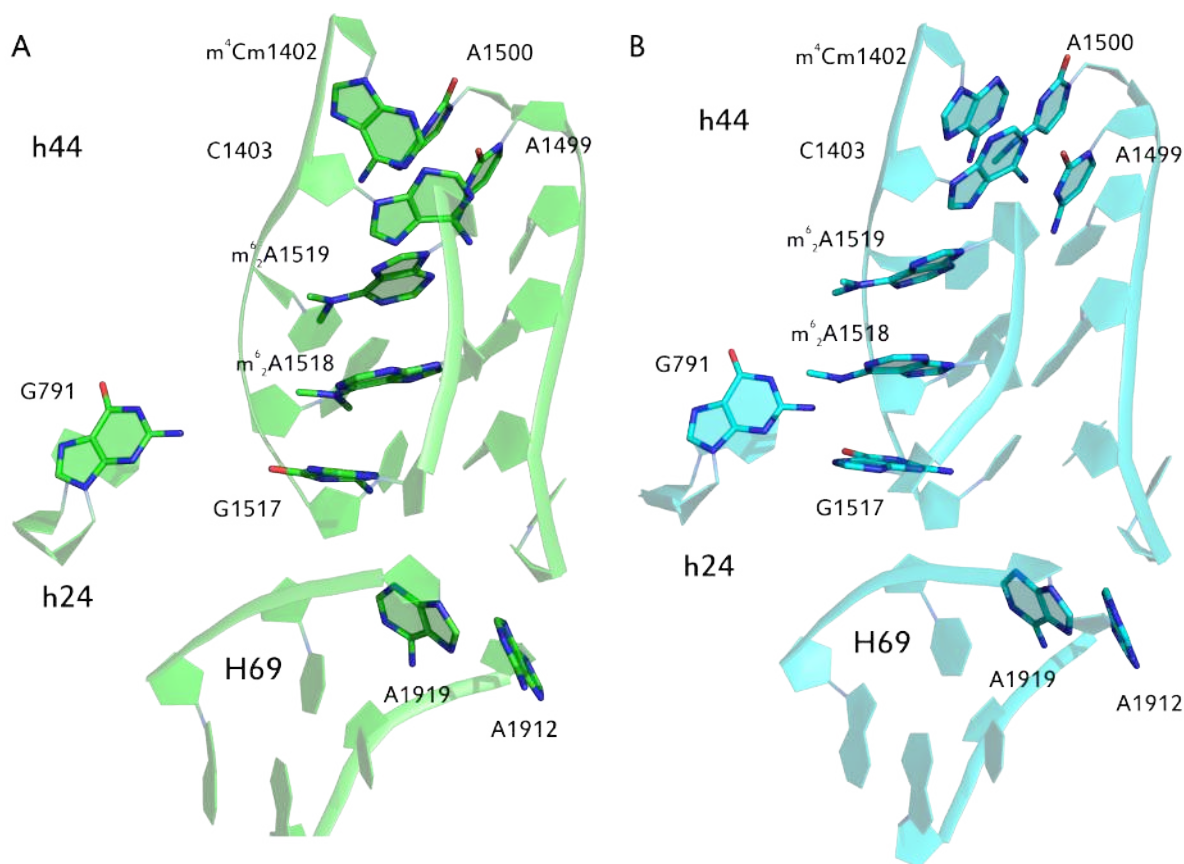


Рис. 3.10. Изменения в районе межсубъединичного моста B2a/d при смене конформационного состояния рибосомы: стопка оснований G1517- m^6_2 A1518- m^6_2 A1519 переключается между водородной связью с G791 и стэкинг-взаимодействием с h44. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние.

“мост B2a/d” и рис. 3.10).

Спираль h44, отходящая от B2a/d образует мост B3 с H71 23S рРНК. Здесь, на этом мосту, замыкаются пути, о которых говорили выше, регулирующие конформацию А-спирали. Так, в AP-состоянии, когда поддерживающая мост шпилька H71 сохраняет свою целостность, в мосту поддерживаются дополнительные связи между G1959 H71 23S рРНК и A1483 h44 рРНК, см. подробнее табл. 3.2 и табл. 3.4, раздел “мост B3”.

Разумеется, описанными переключениями между различными внутренними связями при изменении конформационного состояния отличия между AP и PE состояниями не исчерпываются. Существуют и более широкие “контуры”, ведущие от сайтов связывания E-тРНК к А-спирали или мосту B2a/d. Все обнаруженные переключения связей были также приняты во внимание, и энергии взаимодействия между азотистыми основаниями участвующих в этих переключениях остатков рРНК использовались для анализа основных компонент. Однако, в описательной части

нашей работы мы сосредоточимся на изменениях в этих элементах как наиболее простой наглядной модели.

В свете антагонизма А- и Е-тРНК упомянем также, что попытки получить траектории комплекса рибосомы с тремя тРНК во всех трех каноничных сайтах не увенчались успехом: во всех них существенно искажалась геометрия связывания как минимум одной из тРНК. В любом случае, присутствие Е-тРНК разупорядочивало субстраты ПТР друг относительно друга, поскольку нарушала геометрию связывания ССА-конца А-тРНК. Здесь Е-тРНК выступает как аллостерический ингибитор каталитической функции рибосомы, чья роль, вероятно — это разнесение стадий элонгации во времени. Заметим, что аллостерический антагонизм Е-тРНК проявляется достаточно тонко: ее связывание не вызывает полную диссоциацию А-тРНК, но разобщает лишь некоторые ее связи с рибосомой, чем существенно искажает ее функционально значимое состояние.

Сайт связывания 3'-концевого нуклеотида А76 Е-тРНК — это продолжение спирали Н88 неканоническими парами оснований. Из этой квазиспиральи, в которую встраивается А76 напротив С2394, выпетливается С2426 с тем, чтобы дополнить стопку Р-спиральи (Н80), ответственную за связывание Р-тРНК.

Действительно ли воздействие С75 тРНК через Н93 наиболее значимо для антагонизма с А- и Е-сайтов? С одной стороны, многие из указанных элементов, меняющие свои связи с соседями для создания АР- или РЕ-состояния, универсально консервативны, как и сайт связывания С75 Е-тРНК (чего не скажешь, например, о сайте связывания последнего остатка Е-тРНК, А76: многие остатки, дополняющие спираль Н88 варьируются в различных организмах, хотя структура сайта в целом не меняется). Также косвенным подтверждением событий в траекториях молекулярной динамики, описанных выше, снова являются результаты исследования профиля модификации остатков рРНК Динманом и сотр. Согласно этим данным, в АР-рибосоме *S. cerevisiae* остатки С2959, G2964, А2969, G2972 and G2973 (соответствующие А2590, G2595, А2600, G2603, Ψ2604 *E. coli*) защищены от воздействия реагента, но эта защита отсутствует в РЕ-рибосоме. Это соответствует данным расчетов молекулярной динамики, где соответствующие остатки рибосомы *E. coli* в АР-состоянии находятся внутри спирали Н93, образуя уотсон-криковские пары; в РЕ-состоянии эти взаимодействия нарушаются. . Напротив, остатки С2960 and G2961 *S. cerevisiae* (G2591 and G2592 *E. coli*) по данным группы Динмана не подвержены химической модификации исключительно в АР-состоянии.

Это опять же хорошо соотносится с данными расчетов, где эти два остатка образуют водородные связи с A1966 и A1938, соответственно, и эти связи расходятся в PE-состоянии. Кстати, соответствующие остатки рРНК дрожжевой рибосомы — A2309 и G2281 — сообразно нашей модели также дополнительно экранированы в AP-состоянии относительно PE-состояния.

Некоторые факты о воздействии C75 E-тРНК на A-сайт, казалось бы, обескураживают. Это, например, отсутствие взаимодействия C75 с универсально консервативной стопкой аденинов в рибосомах *T. thermophilus*. В структурах этой термофильной бактерии, чей температурный оптимум находится на отметке 67°C, стопка универсально консервативных аденинов A2432-A199-A2433-A2434 (по номенклатуре *E. coli*) закрыта от взаимодействия с E-тРНК удлиненным фрагментом белка L28 (рис. 3.11). В случае же *E. coli* только His20 в терминальной части бета-петли дотягивается до C75 E-тРНК, но не мешает ему занять свой сайт, а взаимодействует с ним. Означает ли это, что в *T. thermophilus* C75 E-тРНК не оказывает своего воздействия на A-сайт? Это было бы странно, учитывая универсальную или высокую консервативность многих участников передачи этого сигнала. Поскольку исследования аллостерии в *T. thermophilus* выходит за рамки данной работы, мы можем лишь предположить, что в динамической структуре при более высокой температуре фрагмент белка L28 либо освобождает место для прямого взаимодействия C75 E-тРНК с адениновой стопкой, либо опосредует его.

3.5 Мутации в 23S рРНК, снижающие сродство тРНК к А-сайту

Посредством молекулярно-динамического моделирования было показано, что А-сайт рибосомы, связывая тРНК, существенно изменяет свою конформацию, и вслед за ним переключаются нековалентные взаимодействия между остатками РНК по всей рибосоме. Но может ли эта взаимосвязь работать в обратном направлении, так, что состояние рибосомы будет влиять на состояние А-сайта, и, следовательно, его способность к образованию связей с тРНК?

Из изученной нами литературы известны две мутации 23S рРНК, снижающие сродство А-сайта бактериальной рибосомы к тРНК. Одна из них, замена аденина в A2531 на пиримидины, находится на расстоянии более 50Å от А-сайта [67]. Другая

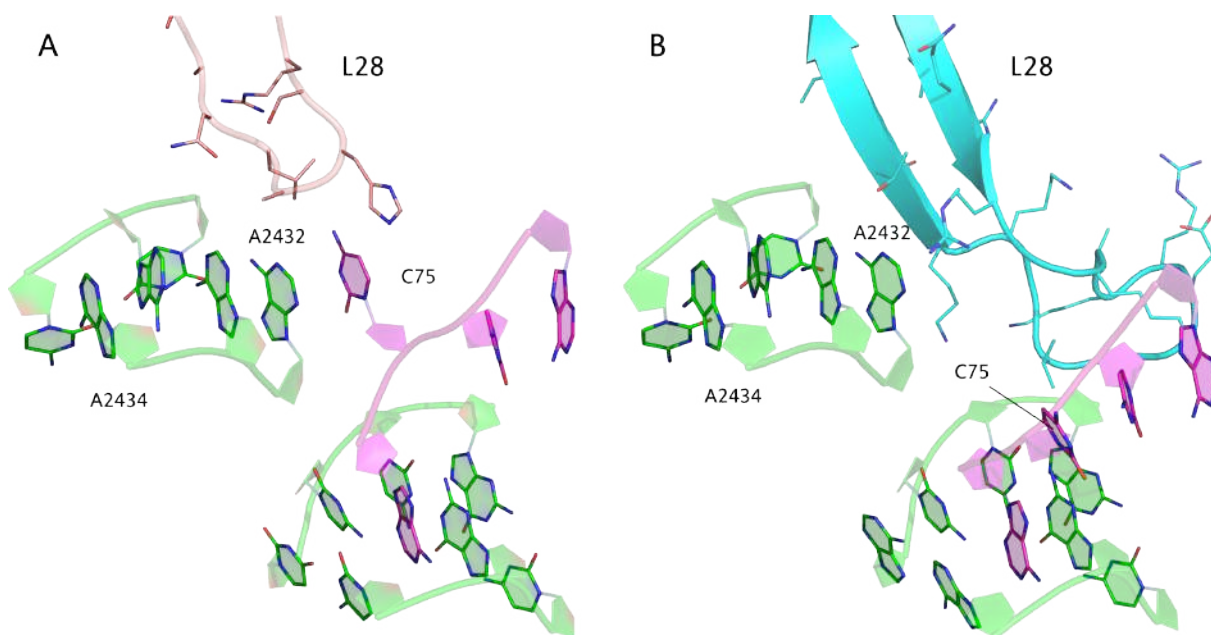


Рис. 3.11. Положение 3'-фрагмента тРНК (изображен пурпурным цветом) в E-сайте рибосомы *E. coli*[PDB id:5AFI] и *T. thermophilus*[PDB id:4V5R]. Фрагменты 23S рРНК изображены зеленым, а петля белка L28 — розовым в случае *E. coli* и голубым — в структуре *T. thermophilus*.

Таблица 3.4. Встречаемость нековалентных взаимодействий в области межсубъединичных мостов В7а, В2а/д и В3, полученные по результатам молекулярно-динамического моделирования. Значения рассчитаны по 4-м независимым траекториям для каждой системы и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Взаимодействие	AP- состояние	PE- fMFT	PE- fMRFFR	AP (A2531U)	AP (UU2492- 3C)	PE- состояние
Мост В7а						
A1848 a702	0.1±0.2	21±21	49±7	45±12	49±5	51±20
A1847 A1848	45±10	15±17	6±10	6±10	0±0	5±8
Мост В3						
G1959/O2'-H...a1483/N1	93±4	95±2	88±9	91±9	95±2	23±25
G1959/N2-H...a1483/N3	96±2	96±3	95±4	98±2	95±6	16±23
a1483/N6-H...g1417/N3	16±12	25±9	19±14	43±46	17±21	73±15
C1958 G1959	96±2	90±5	85±17	49±56	84±8	0.1±0.1
G1949/N2-H...C1957/O2	44±39	88±1	63±52	0±0	48±55	0±0
C1957/N4-H...G1949/O6	66±30	92±8	66±52	0±0	46±54	0±0
Мост В2а/д						
g1497/N2- H...m ⁶ ₂ a1519/N3	0±0	24±41	98±1	46±53	51±32	85±5
a1499 m ⁶ ₂ a1519	43±10	18±31	22±15	18±17	6±12	3±3
g791/N2-H...g1517/O6	0±0	0±0	0±0	0±0	24±49	90±7
g1517/N2-H...c1496/O2	2±4	23±20	13±5	59±34	47±9	83±16

мутация есть замена двух подряд идущих остатков урацила в U2492 и U2493, выпетливающих из Н89 на цитидозин (мутация UU2492-3C [68]). Для выяснения механизма их действия на А-сайт были сконструированы AP-системы мутантных

Таблица 3.5. Встречаемость нековалентных взаимодействий в районе спиралей H93 и H71 23S рРНК, полученные по результатам молекулярно-динамического моделирования. Значения рассчитаны по 4-м независимым траекториям для каждой системы и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Взаимодействие	AP- состояние	PE- fMFT	PE- fMRFFR	AP (A2531U)	AP (UU2492- 3C)	PE- состояние
Внутренняя структура H93						
U2593 C2594	14 \pm 5	54 \pm 10	39 \pm 36	37 \pm 24	79 \pm 5	61 \pm 3
C2601 G2603	97 \pm 2	18 \pm 20	40 \pm 40	81 \pm 28	79 \pm 36	28 \pm 10
G2603/N2-Н...C2591/O2	0 \pm 0	66 \pm 57	98.5 \pm 0.8	62 \pm 45	46 \pm 54	95 \pm 5
C2591/N4-Н...G2603/O6	1 \pm 2	64 \pm 56	94 \pm 5	51 \pm 36	41 \pm 47	94 \pm 12
C2591 G2592	0 \pm 0	34 \pm 36	30 \pm 34	0 \pm 0	0 \pm 0	66 \pm 45
G2588/N2-Н...C2606/O2	98.6 \pm 0.7	96 \pm 3	96 \pm 4	89 \pm 2	38 \pm 32	14 \pm 28
C2606/N4-Н...G2588/O6	96 \pm 2	87 \pm 15	92 \pm 8	93 \pm 4	64 \pm 22	22 \pm 44
Внешние контакты H93						
C1941 C1942	89 \pm 7	56 \pm 45	76 \pm 8	50 \pm 49	54 \pm 39	0.1 \pm 0.2
C1941 C1965	99 \pm 1	32 \pm 56	88 \pm 18	93 \pm 10	87 \pm 14	3 \pm 7
G2592/N2-Н...A1966/N7	99.0 \pm 0.7	13 \pm 23	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A1786 A1938	0 \pm 0	49 \pm 2	50 \pm 23	12 \pm 16	2 \pm 3	56 \pm 4
G1770/N2-Н...A1786/N1	61 \pm 13	81 \pm 6	54 \pm 40	20 \pm 29	20 \pm 23	0 \pm 0
A1785/N6-Н...U1778/O2	98.3 \pm 0.9	98 \pm 2	96 \pm 2	78 \pm 33	85 \pm 5	24 \pm 35
U1778/N3-Н...A1785/N7	95 \pm 2	96 \pm 2	95 \pm 4	85 \pm 25	96 \pm 4	28 \pm 39
G2588/N2-Н...A1785/N1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1 \pm 2	0 \pm 0	57 \pm 34
A1783 A2587	25 \pm 12	28 \pm 15	0 \pm 0	19 \pm 22	57 \pm 6	0 \pm 0
A1783 G2588	3 \pm 3	14 \pm 19	53 \pm 21	28 \pm 25	0 \pm 0	28 \pm 10
Разворот A1937						
A1937/N6-Н...C1934/O2	0 \pm 0	11 \pm 2	12 \pm 21	0 \pm 0	0 \pm 0	32 \pm 27
A1937/N6-Н...G1964/N3	30 \pm 21	0 \pm 0	0 \pm 0	51 \pm 27	0 \pm 0	0 \pm 0
G1964/N2-Н...A1937/N1	96 \pm 3	0 \pm 0	0 \pm 0	93 \pm 7	0 \pm 0	0 \pm 0

рибосом (для первого случая была выбрана мутации A2531U с наиболее выраженным эффектом), и для них были получены по 3 независимые траектории длиной 200 нс. Для анализа использовались объединенные траектории последних 100 нс расчетов каждой из траектории — участков со стабильными RMSD (рис. 3.1, E и F) и потенциальной энергией рибосомы (рис. 3.2, E и F). Положение введенных мутаций в структуре 23S рРНК относительно А-сайта показано на рис. 3.12.

В результатах моделирования обе мутации действительно дестабилизировали характерные связи ССА-конца тРНК в А-сайте: дестабилизировался его сплошной стэкинг с А-спиралью, а в некоторых траекториях С74 полностью выходил из этого сайта. Сама же А-спираль при этом частично или полностью возвращалась в состояние, характерное для PE-систем, где в замыкающей эту шпильку петле выстраивается сплошная стопка G2553-U2554-U2555 (рис. 3.4, C и D; количественно встречаемости связей можно сравнить в табл. 3.6, раздел “А-сайт”).

Кроме того, из этих же литературных данных известно, что мутации существенно

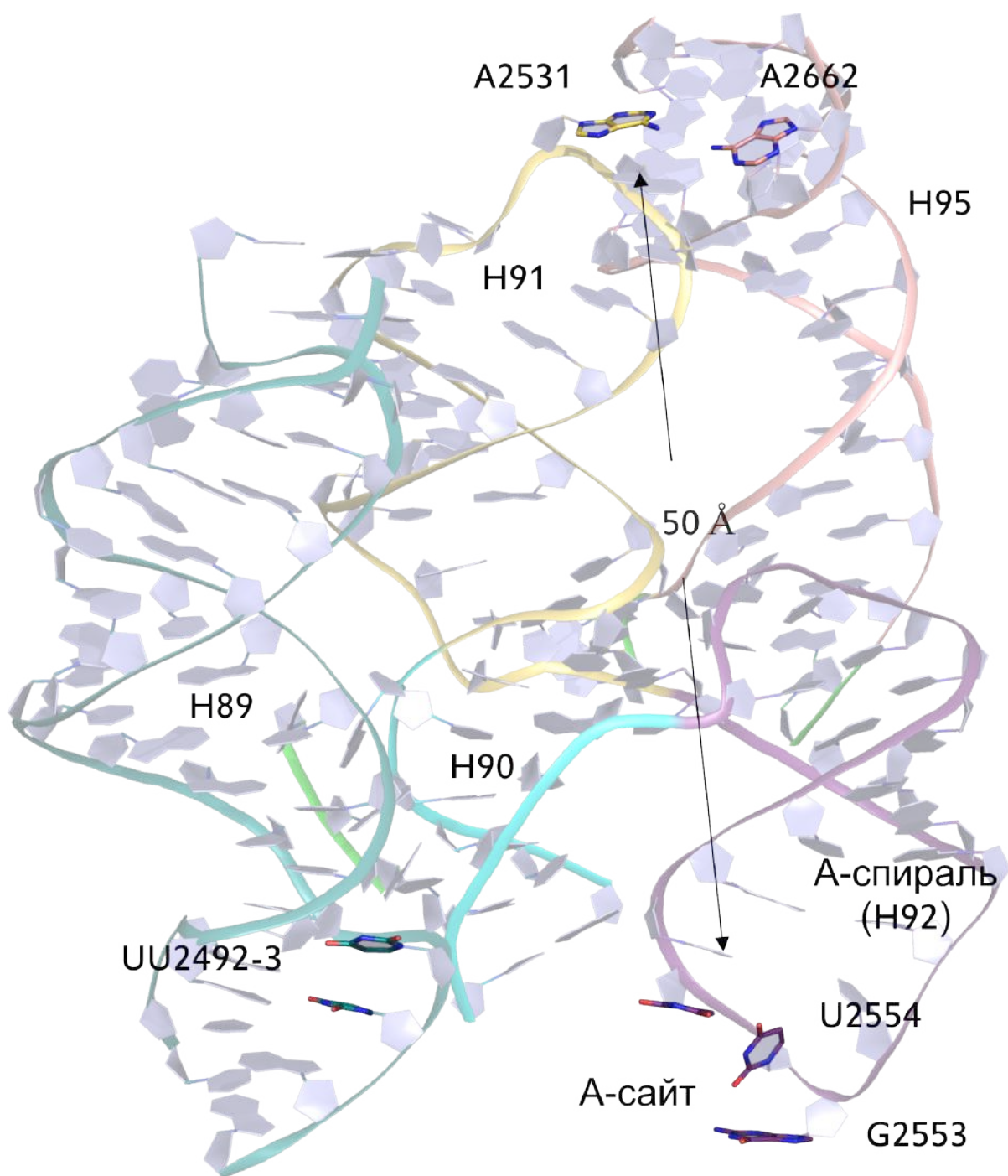


Рис. 3.12. Фрагмент 23S рРНК, содержащий А-спираль и шпильки, в которых были произведены мутации UU2492-3С и А2531U. Каждая из изображенных и подписанных шпильек имеет свой цвет.

меняют профиль модификации ряда оснований 23S рРНК; молекулярно-динамическое моделирование мутантных систем могло бы объяснить результаты этих, весьма удаленных от мутаций, изменений. Этим модификациям мы подробно посвятим целый раздел, пока же сосредоточимся на механизме влияния мутаций на А-спираль и, в свете этого, на аллостерических и конформационных свойствах рРНК.

3.5.1 Мутация A2531U

Данная мутация расположена в петле, замыкающей спираль H91 в месте ее сочленения с H95, иначе именуемой сарцин-рициновой петлей (англ. sarcin-ricin loop, SRL). Аденин A2531 23S рРНК образует две водородные связи с A2662, тем самым скрепляя вершины шпилек H91 и H95 третичным контактом наряду с хугстиновской парой G2663-G2532. Как было показано в работе по мутагенезу [67], именно контакт A2531–A2662 является функционально важным: различные мутации этих двух оснований подавляют рост бактериальных клеток либо вовсе делают их нежизнеспособными, в то время как мутации в G2663-G2532 не оказывают заметного эффекта на жизнеспособность клеток. Подробное исследование двух нелетальных, но подавляющих размножение бактерий, мутаций, а именно замена аденина в A2531 на пиримидин (т.е. мутаций A2531C и A2531U), выявило нарушение ими конкретных стадий элонгации: активации гидролиза ГТФ фактора EF-G, и, что более важно для нас в свете поставленной задачи, стабильность связывания рибосомой aa-tРНК, доставляемой третичным комплексом: так, рибосома с мутацией A2662C удерживала только 75% меченой [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} по сравнению с диким типом, а с мутацией A2531U — всего 53%. При этом двойные мутации, такие, как A2531G/A2662C, порождали штаммы с нормальной скоростью роста, несмотря на то, что любая из этих замен, произведенная по отдельности, была летальна. Таким образом, межспиральный контакт в области A2531-A2662 способен влиять на состояние A-спирали.

Для изучения взаимосвязи шпильки H91 с A-сайтом был смоделирован комплекс рибосомы в AP-состоянии с мутацией A2531U (см. раздел “Методы”). Из подготовленной системы было получено три траектории длиной 200 нс. Для анализа конформационных изменений использовались конечные участки в 100 нс длиной из каждой независимой траектории.

В ходе молекулярно-динамического моделирования контакт между аденинами A2531 и A2662 действительно оказался динамичным и зависящим от состояния самой рибосомы (в отличие от неизменного контакта между G2663 и G2532): их взаимное расположение различалось в AP-состоянии рибосомы и в траекториях PE-состояния. Мутация A2531U приводила к замене двух водородных связей с A2662 на одну, существенно более слабую (табл. 3.6, раздел “SRL”).

Переконфигурация контакта между H91 и SRL привела к изменению в обоих шпильках. Сарцин-рициновая петля ослабила свою связь с основанием A-спирали,

разорвав водородную связь между A2564 (A–спираль) и C2646 (SRL), подобно тому, как это наблюдалось в PE–состоянии (табл. 3.6, раздел “SRL”). H91 в месте соединения переходит в H90, относимой к предполагаемой “проторибосоме”, и поэтому у H91 и H90 общий стебель парных стопок оснований 23S рРНК. Изменения в H91 и ее связях привели к упрочнению связей пар G2574-C2512 и C2575-U2511, подобно тому, что происходило с ними в PE–состоянии. Участники этой пары, прочнее связываясь внутри H90, освобождают своего соседа, C2573, от взаимодействий с C75 A–РНК. Это определенно вносит свой вклад в дестабилизацию тРНК в A–сайте, хотя действие мутации на A–сайт на этом не заканчивается.

Многие взаимодействия остатков рРНК, что были рассмотрены ранее как потенциальные участники передачи сигнала между A– и E–сайтами, в рибосоме с мутацией A2531U во многом воспроизводили ее PE–состояние. В результате в системе с мутацией A2531U оказались повреждены практически все связи, удерживавшие ранее ССА–конец тРНК в ПТЦ в AP–состоянии, ослабляясь как минимум в одной из трех траекторий. При этом разрушается и часть внутренних связей тРНК: например, стэкинг C74 и C75, как и некоторые внутренние связи A–тРНК (табл. 3.6, раздел “A–тРНК”). Неудивительно, что в результате полностью пропадает водородная связь между потенциальными участниками ПТР, а аминокислотные фрагменты на A– и P–тРНК оказываются дезориентированы друг относительно друга (рис. 3.5).

Основание Ψ 2580 на конце H90, которое в AP–состоянии выворачивается из спирали по направлению к РТ в мутантных рибосомах возвращалось во внутриспиральное положение — то положение, которое оно занимало в PE–состоянии (табл. 3.1, раздел “ Ψ 2580 и его окружение”). Также в PE–состояние переходят многие связи, ведущие к спирали H93, образующей наиболее прямое соединение между сайтами связывания A– и E–тРНК, и отчасти восстанавливается мост В7а, что отображено в таблицах 3.2 и 3.6. Это позволяет заключить, что одно точечное изменение в сочленении спиралей смещает равновесие состояний различных элементов по всей рибосоме в сторону их PE–состояния.

Насколько далеко и глубоко простирается это изменение, мы обсудим после рассмотрения следующей мутации.

Есть еще один участник AP–PE переключений между H90 и H91, которого мутации переводят в PE–состояние. Это аденин A2518, выпетливающийся из шпильки для образования стопки консервативных оснований A1127-A2518-G1128-A1129, соединяющей спираль H90 с H89. Мутация возвращает конформацию A2518 в

Таблица 3.6. Некоторые нековалентные взаимодействия, изменяющиеся при введении мутаций A2531U и UU2492-3C в AP-состояние. Данные молекулярно-динамического моделирования, полученные по 4-м независимым траекториям для каждой системы, представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Взаимодействие	AP- состояние	AP (A2531U)	AP (UU2492- 3C)	PE- состояние
A-сайт и тРНК				
(A-tRNA)C74 U2555	87 \pm 23	33 \pm 57	17 \pm 30	0 \pm 0
U2554 U2555	7 \pm 14	90 \pm 14	69 \pm 38	68 \pm 28
G2553 U2554	0 \pm 0	91 \pm 6	91 \pm 9	96 \pm 3
Ψ 2580/N3-Hx...G2508/O6	0 \pm 0	69 \pm 21	72 \pm 34	86 \pm 15
G2508/N1-Hx...Y2580/O4	0 \pm 0	96 \pm 3	1 \pm 2	91 \pm 8
Ψ 2580/N1-Hx...G2582/O6	32 \pm 23	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A896 (A-tRNA)C56	75 \pm 21	68 \pm 4	31 \pm 26	0 \pm 0
H89				
A2459/N6-Hx...U2493/O4	99.2 \pm 0.5	98.9 \pm 0.3	0 \pm 0	98.7 \pm 0.5
U2493/N3-Hx...A2459/N1	95 \pm 3	92 \pm 3	0 \pm 0	96 \pm 3
A2459/N6-Hx...G2458/N3	31 \pm 8	48 \pm 9	15 \pm 22	39 \pm 11
U2492/N3-Hx...U2460/O2	86 \pm 8	85 \pm 3	0 \pm 0	86 \pm 2
U2460/N3-Hx...U2492/O4	98.5 \pm 0.9	97.7 \pm 0.9	0 \pm 0	99.0 \pm 0.2
Ядро 50S				
G2495/N2-Hx...A959/N1	38 \pm 44	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A959/N6-Hx...G2495/N3	46 \pm 53	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
G2495/N2-Hx...A960/N3	26 \pm 46	99.8 \pm 0.1	99 \pm 2	98.8 \pm 0.7
C961 A2031	0 \pm 0	75 \pm 5	72 \pm 5	64 \pm 21
C961/N4-Hx...A2031/N7	47 \pm 32	0 \pm 0	0 \pm 0	2 \pm 4
A2031 Cm2498	0 \pm 0	61 \pm 11	59 \pm 11	36 \pm 26
Cm2498 C2499	37 \pm 12	86 \pm 12	71 \pm 28	89 \pm 10
G2454/N1-Hx...Cm2498/N3	0 \pm 0	24 \pm 23	2 \pm 3	59 \pm 30
G2454/N2-Hx...Cm2498/N3	5 \pm 4	69 \pm 48	61 \pm 32	62 \pm 37
GAC и SRL				
A2750/N6-Hx...U1033/O2	0 \pm 0	33 \pm 32	0 \pm 0	0 \pm 0
U1033 A2750	40 \pm 12	21 \pm 4	61 \pm 9	65 \pm 3
U1061 A1070	75 \pm 5	0 \pm 0	16 \pm 10	17 \pm 10
C1044 A1111	0 \pm 0	51 \pm 24	0 \pm 0	0 \pm 0
C1045 A1111	2 \pm 4	70 \pm 6	26 \pm 27	34 \pm 34
A2564/N6-Hx...C2646/O2'	74 \pm 30	0 \pm 0	0 \pm 0	3.6 \pm 0.5

PE-состояние (рис. 3.15, А).

3.5.2 Мутация UU2492-3C

Вторая мутация, относительно которой экспериментально доказано, что она дестабилизирует связывание тРНК в А-сайте — это результат попытки экспериментаторов вместо сложной структуры компланарных троек оснований в H89 получить правильную уотсон-криковскую спираль. Для этого два подряд идущих урацила 2492-2493 23S рРНК заменили на цитозин в расчете на формирование

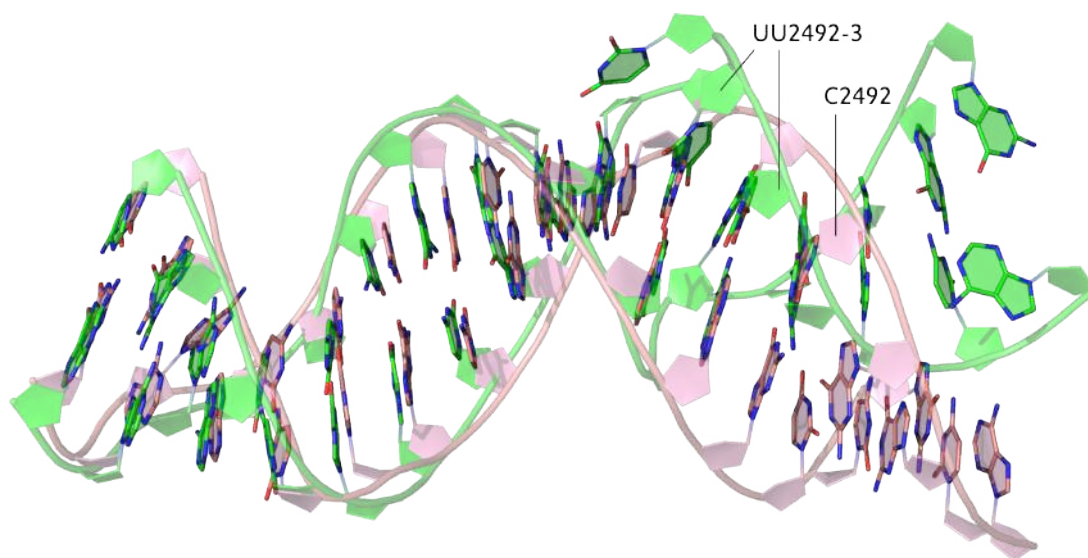


Рис. 3.13. Сравнение реальной (зеленая) и гипотетической целевой для авторов работы [68] (розовая) структур H89 23S рРНК *E. coli*. Мутация UU2492-3С, по замыслу авторов [68], должна была привести к формированию уотсон-криковской спирали практически на большей части ее длины, однако, такая структура ликвидировала бы изгиб спирали, формируемый в районе остатков UU2492-3С, что вряд ли было бы энергетически возможно в плотной укладке ядра 23S рРНК..

им уотсон–криковской пары с G2458. Однако, никакими методами оптимизации с наложением позиционных и/или дистанционных ограничений нам не удалось получить уотсон-криковские пары желаемых нуклеотидов, что неудивительно: правильная уотсон-криковская спираль не может обеспечить резкого изгиба, который есть у реальной H89 в обозначенном районе (рис. 3.13). При плотной упаковке рРНК, особенно вблизи пептидилтрансферазного центра, полная уотсон-криковская структура должна разрушить всю укладку рибосомы, что должно быть крайне энергетически невыгодно. Кроме того, данные исследования мутации UU2492-3С свидетельствуют о том, что рибосома в целом сохранила свою функциональность, повреждены оказались лишь некоторые ее функции, и при том частично [68], что явно не свидетельствует в пользу образования уотсон-криковской спирали по всей длине H89 ценой полной переконфигурации функционального ядра рибосомы. Поэтому при подготовке стартовой системы для молекулярной динамики после замены мы ограничились лишь оптимизацией этого основания в спирали H89 и оптимизацией самой спирали H89 расчетом короткой динамики при наложении позиционных ограничений на один атом остальных остатков РНК и белков (см. раздел “Методы”).

Полученный таким образом эффект от мутации UU2492-3С — это исчезновение связей с участием остатков U2492 и U2493, так, что компланарные тройки U2492–U2460–G2490 и U2493–A2459–G2458 (консервативные у бактерий, а также

среди эукариот, но отличные от бактериальных) превращались в соответствующие пары, а замещающий два уридина цитидин выпетливался, не образуя никаких стабильных и статистически значимых связей. Сместившееся основание A2459 перестает взаимодействовать с C957 из H39 23S рРНК. Получается интересная параллель с предыдущей мутацией: обе они перекофигурируют контакты между спиральями, связанными с “проторибосомой” и, в конечном итоге, А–спиралью, смещая равновесие в последних в сторону РЕ–состояния даже при наличии А–тРНК (табл. 3.6, раздел “Область H89”).

Эффект от расхождения контакта между H39 и H89 распространяется в том числе через основание C961, которое вместо общей стопки с A983 и оторванности от H89 (как в AP–состоянии), поддерживает стопку C961-A2031-Cm2498-C2499 (как в РЕ–состоянии) в области перехода между H89 и H74 в центре “проторибосомы”. Также принимают РЕ–подобные состояния и другие контакты в этой области, например, G830 образует стэкинг–взаимодействие с A2448 вместо альтернативного A945, что формируется в AP–состоянии.

Точно, как и A2531U, мутация UU2492-3C восстанавливала связи Ψ 2580 внутри H90 и удаляла C2573 от взаимодействия с C75 А–тРНК. Аналогично предыдущей мутации, мутация UU2492-3C изменяла состояние H93 и связанных с ней межспиральных элементов на РЕ–подобное. Эта мутация уже полностью восстанавливала мост В7а, ранее наблюдавшийся сомкнутым только в присутствии Е–тРНК в своем сайте. И, конечно же, эта мутация тоже нарушала характерные связи ССА–конца в А–сайте, провоцируя А–спираль занять РЕ–состояние со сплошным стэкинг–взаимодействием оснований ее вершины (табл. 3.2).

Мутация UU2492-3C, ровно как и A2531U, приводит к разрушению других связей А–тРНК, как внутренних, так и внешних. У А–тРНК есть еще одна значимая точка крепления к рибосоме — это вершина т.н. А–пальца (А–site finger, ASF) или H38. В результате оптимизации А–тРНК в рибосоме и последующего расчета молекулярной динамики сформировалось стэкинг–взаимодействие между C56 тРНК и A896 H38, стабильное в AP–состоянии. Сопровождалось это некоторыми перегруппировками связей в самой H38 (табл. 3.6, раздел “H38”). Эта спираль уже упоминалась в литературном обзоре как потенциальный проводник аллостерического сигнала из Е–сайта в ГТФазный центр элонгационного фактора G, однако, не единственный [138].

Мутация UU2492-3C настолько исказила А–тРНК, что ее связь с A896 H38 оказалась нарушена (табл. 3.6, раздел “А–сайт и тРНК”).

Таким образом, обе мутации, известные своей способностью снижать сродство А-сайта к тРНК, вызывали изменение межспиральных контактов и, вследствие этого, многочисленные конформационные перестройки по всем найденным путям передачи сигнала из Е-сайта в А-сайт, формирующие конформации фрагментов рРНК, близкие к таковым в РЕ-состоянии. Насколько же далеко по рибосоме простираются подобные изменения? Для этого мы проанализировали встречаемости всех связей, что стабильно и воспроизводимо отличаются между AP- и РЕ-состояниями системы, а также энергии взаимодействия между избранными парами остатков, формирующих подобные связи (подробно критерии отбора описаны в разделе “Методы”, подраздел “Методы анализа траекторий” 4.3). Это позволило установить, что, во-первых, мутационные изменения, воспроизводящие РЕ-состояние, присутствовали во всех доменах 16S и 23S рРНК, а также в 5S рРНК, визуальнo будучи распределены по всей рибосоме. Это дополнительно подтверждает концепцию, согласно которой для аллостерического ответа нужна целая рибосома.

Второй момент, который хотелось бы прояснить — это степень смещения мутациями конформации рибосомы в сторону РЕ-состояния. Ее можно приблизительно оценить, во-первых, по количеству связей, которые воспроизводят РЕ-состояние, во-вторых, более точно, по энергиям взаимодействия между азотистыми основаниями остатков, что образуют переключающиеся связи. Для интегральной оценки по последнему критерию энергии взаимодействия между парами оснований с переключающимися связями были подвергнуты анализу методом главных компонент. Анализ проводился на данных, включающих в себя энергии стабильных участков последних 100 нс траекторий AP- и РЕ- состояний вместе взятых. В результате удалось выделить главную компоненту, которая объясняла 68% дисперсии объединенных данных.

Если изобразить проекцию имеющихся данных на эту компоненту, то можно увидеть резкое и стабильное отличие AP-состояния от РЕ. Этим же не могут похвастаться все прочие компоненты, следующие за главной в порядке убывания доли объясняемой ими дисперсии (рис. 3.14). Поэтому именно первую главную компоненту можно считать обобщенной характеристикой смещения системы в сторону AP- или РЕ- состояния.

Так вот, среднее значение проекции значений энергии на главную компоненту для AP-состояния равно 261 ± 19 (с учетом стандартного отклонения), для РЕ-состояния — -233 ± 20 . Аналогичные значения для систем рибосом с мутациями A2531U и UU2492-3C, содержащих А- и Р-тРНК, оказались равны 37 ± 19 и 27 ± 20 , соответственно. Мутации,

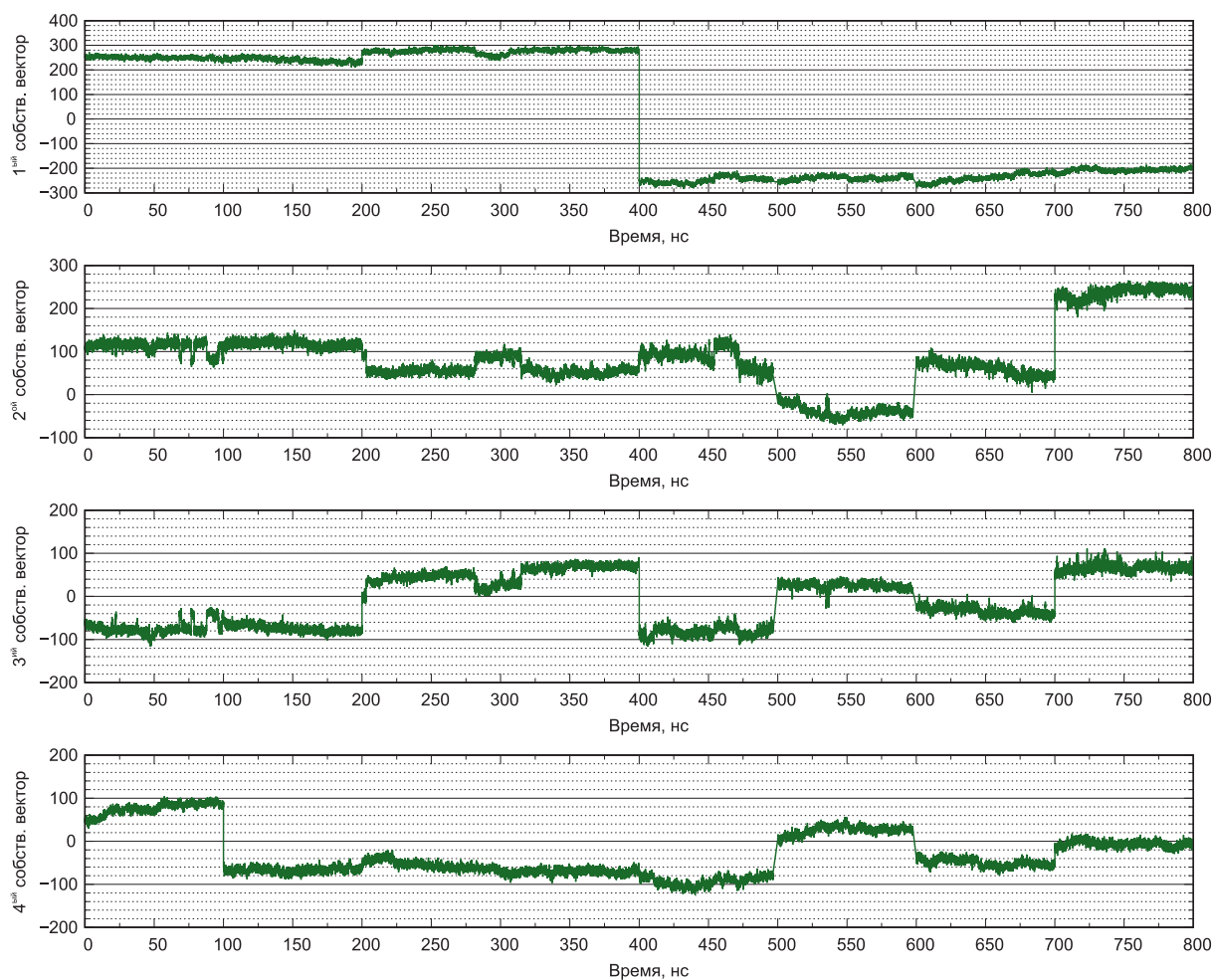


Рис. 3.14. Отображение первых четырех главных компонент анализа совокупности потенциальных энергий взаимодействия азотистых оснований определенных остатков рРНК. Графики приведены для объединенной траектории по следующему принципу: в одну временную шкалу слиты 4 участка последних 100 нс расчетов моделирования в AP-состоянии, затем — 4 участка по 100 нс моделирования рибосомы в PE-состоянии. На графиках видно, что только для первой главной компоненты есть четкая и воспроизводимая разница между AP- и PE-состояниями.

таким образом, даже при наличии A-тРНК в системе, примерно на половину смещают ее конформационное состояние в сторону такового при связывании E-тРНК.

3.5.3 Степень модификации оснований рРНК: влияние мутаций

Вышеупомянутые мутации A2531U и UU2492-3C, ослабляющие удержание тРНК в A-сайте рибосомы, изменяли профиль модификации остатков 23S рРНК стандартными реагентами: DMS, CMCT и кетоксалем (заметим, что для A2531U и A2531C исследовалась не вся 23S рРНК, а только ее участки с номерами остатков 990–1140, 2080–2600 и 2630–2780).

Несмотря на схожий эффект на А-сайт, перечень оснований рРНК, чья реакционная способность поменялась, у этих мутаций совпадает лишь в нескольких пунктах: A2572 H90, выпетливающийся из спирали недалеко от ПТЦ и три нуклеотида на самой вершине SRL: A2657, A2662 и G2661. Все прочие изменения индивидуальны для каждой из мутаций.

Начнем сравнение с результатами молекулярно-динамического моделирования с самых удаленных от центра участков — это изменения в протуберанце L7/L12, или GAC (GTPase associated center, центр связывания ГТФаз, H42-44 23S рРНК, не считая белков). При мутации A2531U возрастает доступность выпетливающих оснований U1033 H42 и U1061 H43 для реагента СМСТ, при уменьшении таковой для G1038 и G1042 внутри спирали H42. Довольно объемный реагент СМСТ вступает в реакцию с амидным азотом гетероциклических оснований, атакуя его перпендикулярно плоскости основания, поэтому на реакционную способность основания с этим реагентом, как правило, влияет стабильность стэкинг-взаимодействий с соседями, стерически затрудняющими подход реагента. Первое из упомянутых оснований, U1033, образует третичный стэкинг-контакт с A2750 H97 23S рРНК (оба нуклеотида выпетливаются из своих спиралей). В данных молекулярно-динамического моделирования этот контакт при мутации A2531U заметно ослаблен, однако, мутация UU2492-3C его не дестабилизирует. U1061 также образует одиночный стэкинг-контакт с A1070, и, действительно, мутация A2531U способствует полному расхождению U1061 и A1070, в то время как UU2492-3C — нет (табл. 3.6, раздел “GAC”).

Радикальное изменение конформации U1061, полностью отводящее его от взаимодействия с A1070, лучше всего наблюдать в изменениях конформационного угла U1061 (рис. 3.15, В). На этом графике хорошо видно, что при мутации A2531U изменения в положении U1061 делают его полностью доступными для атаки реагентом со стороны плоскости кольца, в то время как воздействие UU2492-3C лишь незначительно смещает и размазывает основной пик распределения значения угла.

Несколько сложнее объяснить сверхзащищенность остатков G1038 и G1042, находящихся внутри спирали H42 в парах с C1117 и U1113, соответственно. В траекториях системы с мутацией A2531U происходит воспроизводимая стабилизация стопки C1044–A1111–C1045 на вершине H42 относительно обычного AP-состояния, и стабилизация этой стопки характерна исключительно для мутации A2531U (табл. 3.6, раздел “GAC”). Дополнительные прочные связи должны предотвращать спонтанное

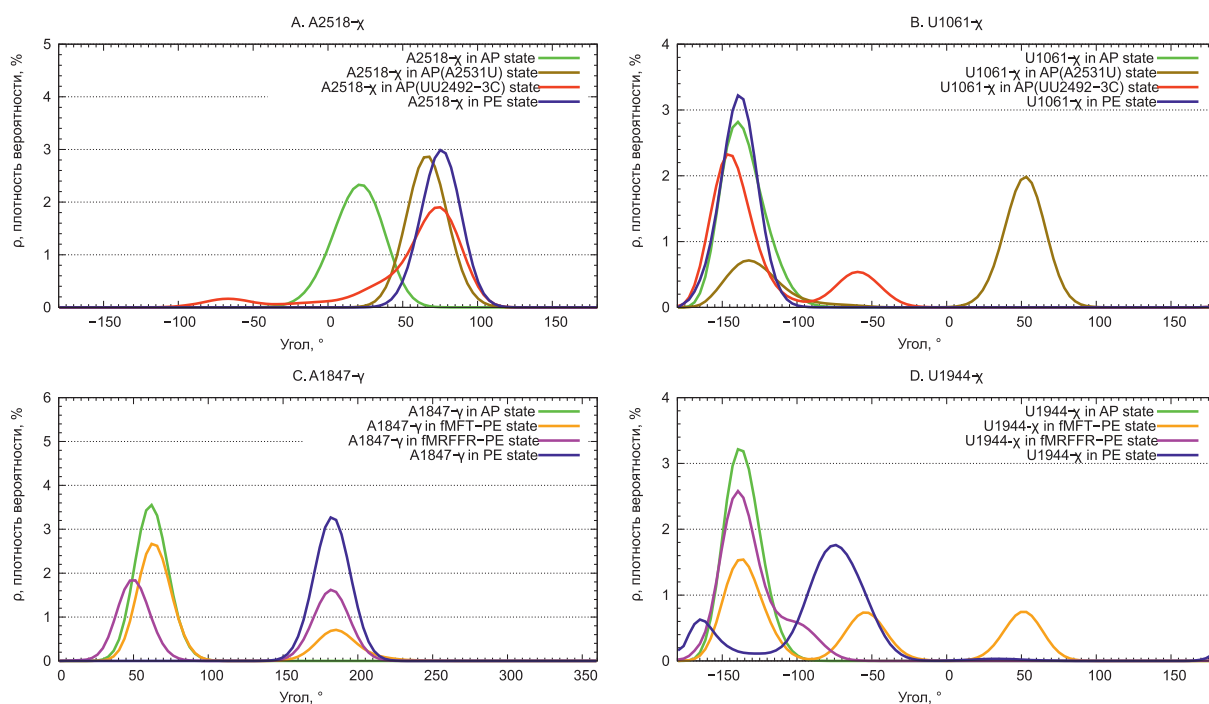


Рис. 3.15. Распределение величин конформационных углов некоторых остатков 23S рРНК в различных состояниях рибосомы. На осях x — значения торсионных конформационных углов, названных в подписях над графиком.

ослабление стэкинга на вершине шпильки в случае G1042 или на ее изгибе, где расположен G1038, а ведь именно спонтанное ослабление стэкинга и обеспечивает определенную доступность гуанинов для реакции с СМСТ. И снова, в полном согласии с экспериментом, мутация UU2492-3C не вносит каких-либо значимых в связи спирали H42 в данных молекулярно-динамического моделирования.

В целом, соответствие многих экспериментальных данных феноменам, наблюдаемым в траектории молекулярной динамики свидетельствует о достоверности выбранной модели и адекватности протокола подготовки систем к молекулярно-динамическому моделированию. Это означает, что подобный протокол можно использовать и в дальнейшем для исследования аллостерических явлений в рибосоме.

3.6 Влияние пептидов в РТ на Е-тРНК

Исследования взаимодействий Е-тРНК с другими тРНК методом smFRET в 2011 году наглядно показали, что вновь синтезированная пептидная цепь в зависимости от длины и состава способна снижать аффинность Е-сайта рибосомы к тРНК. После достижения пептидной цепью длины в 4-5 аминокислот она уже индуцирует диссоциацию тРНК из Е-сайта в миллисекундных масштабах времени,

до того, как следующая по кодону aa-тРНК свяжется в А/Т-сайте рибосомы (хотя этот переход может произойти и на более ранних циклах элонгации, в зависимости от последовательности пептидной цепи), [80]. Еще раньше, в 1990-х годах была продемонстрирована неспособность Е-тРНК удерживаться в своем сайте в эксперименте с fMet-Phe-Thr-пептидом на Р-тРНК в рибосомном туннеле [78].

Поэтому для изучения возможного механизма влияния пептида, находящегося в РТ на тРНК в Е-сайте были выбраны, во-первых, пептид fMet-Phe-Thr (fMFT) из работы 1990-х годов, а, во-вторых, пептид fMRFFR из исследований взаимодействия тРНК с рибосомой методом smFRET. В качестве исходной структуры для добавления пептидов на Р-тРНК был выбран один из кадров расчетов РЕ-состояния, наиболее близкий к центроиду основного кластера для остатков 23S рРНК в ПТЦ и РТ (см. гл. “Методы”, раздел “Моделируемая система” 4.1). Начальная конформация пептидной цепи была выбрана по результатам докинга этой цепи во фрагменте рибосомного туннеля, после чего она была дополнительно оптимизирована короткой динамикой с позиционными ограничениями на один атом остатков рибосомы и тРНК. Для каждой из систем, т. е. с каждым из пептидов, были получены по четыре траектории длиной 200 нс.

Положение и связи Е-тРНК действительно изменились при моделировании систем с добавлением упомянутых пептидов. Оба пептида взаимодействовали с остатками U2585, U2586 и U2506, до которых формилметиониновый остаток не дотягивался (рис. 3.16).

Взаимодействие с остатками U2585 и U2586, непосредственно прилегающими к Н93, привели к изменению конформации этой шпильки с переключением связей в те положения, что уже наблюдались в AP-состоянии (для подробностей см. табл. 3.2). Это оказывало свое влияние на сайт связывания С75 Е-тРНК: основания U2074 и G2238 образовывали связи, также воспроизводящие AP-состояние. Эти остатки находятся в консервативном узле на стыке шпилек Н74, Н75 и Н93, переключающимся в ответ на изменение положения универсально консервативной стопки A2432-A199-A2433-A2434, непосредственно ответственной за связывание С75 Е-тРНК. Переключение Н93, а следом и консервативного узла, сместило и стопку Е-сайта примерно на половину расстояния между основаниями в стэкинг-взаимодействии. Это не преминуло сказаться на прочности связей, удерживающих Е-тРНК, чье связывание как раз зависит от правильной взаимной ориентации всех ее сайтов связывания в пространстве: уменьшились встречаемости связей А76 и в целом акцепторного стебля

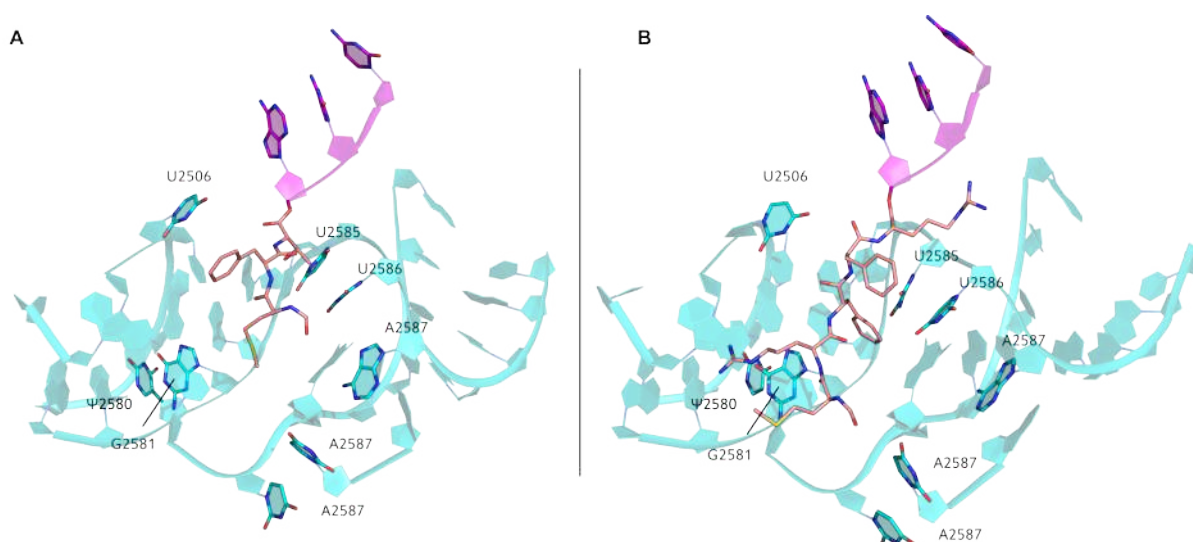


Рис. 3.16. Положение коротких пептидов на Р–тРНК в туннеле согласно данным молекулярно-динамического моделирования РЕ–состояния рибосомы. Показаны центры основных кластеров последних 100 из 200 нс четырех независимых траекторий. ССА–фрагменты Р–тРНК отображены пурпурным цветом, пептидный фрагмент – розовым. **А.** Пептид fMFT. **В.** Пептид fMRFFR.

с рибосомой (см. табл. 3.3).

Положение Е–тРНК в наведенном АР–подобном состоянии рибосомы оказалось настолько искажено, что разрывало внутренние связи самой Е–тРНК, самый яркий пример которого — это расхождение уотсон–криковской пары G20 и C57 на изгибе тРНК в месте стэкинг-контактов ее с протуберанцем L1 (табл. 3.3, раздел “Протуберанец L1”). Это хорошо объясняет результаты предшествующих экспериментов, поскольку сильно искаженная структура тРНК с разрывом множества внутренних связей должна быть энергетически невыгодной.

Интересно также установить, насколько воздействие от пептидов в РТ продвинулось по направлению к А–сайту, антагонисту Е–сайта. Непосредственно структура А–спирали изменилась мало, однако, Н93 в присутствии пептидов в РТ можно считать в значительной степени переключившейся в АР–состояние; это вызвало, в том числе, восстановление целостности перемычки А1966–С1965–С1941–С1942–U1943, ведущей к Н71. Спираль Н71 также восстанавливает свои внутренние связи, ранее удерживавшиеся только в АР–состоянии, как и дополнительные связи межсубъединичного моста В3 через остаток G1958 Н71.

Остаток U1944, который соединяет Н71 с А–спиралью, судя по конформационному углу χ изменял свою конформацию на ту, что наблюдалась ранее в АР–состоянии (рис. 3.15, D).

Изменение взаимодействий Е–тРНК с рибосомой (табл. 3.5, раздел “Связи Е–

тРНК с 23S рРНК” и “Внутренние связи E–тРНК”) рибосомы привело к увеличению подвижности остатков 700-708 h23 16S рРНК, в результате чего ослабляются некоторые связи межсубъединичного моста В7а (табл. 3.4, раздел “Мост В7а”), а конформация участника этого моста А1847 смещается в сторону AP–состояния (рис. 3.15, С), при этом связь другого участника моста — Н68 — с акцепторным стеблем E–тРНК ослабляется (табл. 3.5, раздел “Связи E–тРНК с 23S рРНК”).

Таким образом, выбранные пептиды действительно дестабилизируют E–тРНК в соответствии с экспериментальными данными, при этом используя антагонизм AP– и PE–состояний, переводя часть аллостерически чувствительных элементов в AP–подобное состояние.

3.7 Предположительный механизм воздействия антибиотиков, связывающихся в РТ, на А–сайт

Молекулярно-динамическое моделирование выявило способность А–спирали переключаться между двумя состояниями, лишь одно из которых выгодно для образования новой пептидной связи, поскольку только в нем субстраты будущей реакции фиксированы друг относительно друга. Такое переключение очевидно может быть задействовано для аллостерической остановки синтеза пептидной цепи. Существует множество свидетельств того, что верхняя часть рибосомного туннеля непосредственно участвует в подобной регуляции (см. раздел “Аллостерическая регуляция пептидилтрансферазного центра рибосомы” в обзоре литературы): антибиотики, связывающиеся в верхней части РТ, останавливают трансляцию через определенное количество циклов элонгации, т. е. совместным воздействием короткого вновь синтезированного пептида и низкомолекулярного лиганда.

Исследование механизма воздействия тех или иных антибиотиков — тема более чем обширная и изначально не предполагалось в рамках излагаемого исследования. Поэтому здесь мы изложим результаты лишь первых шагов по направлению к изучению динамики поведения антибиотикам в РТ, а именно выяснению того, как связывающийся антибиотик может влиять на свое окружение и способен ли он вызывать переключение состояния А–спирали по тому же механизму, что и другие, более удаленные, аллостерические эффекторы.

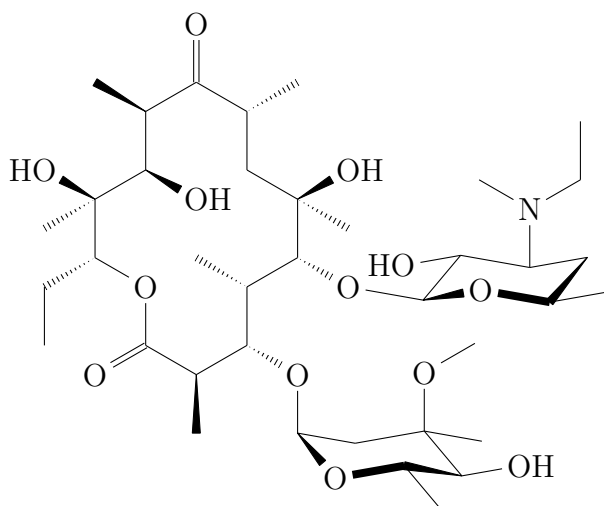


Рис. 3.17. Эритромицин.

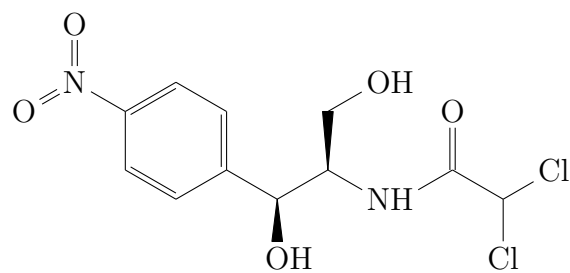


Рис. 3.18. Хлорамфеникол.

Исследование РТ в системе, содержащей всю рибосому, мы начали с двух распространенных антибиотиков различных семейств: эритромицина и хлорамфеникола.

3.7.1 Эритромицин

Эритромицин — это антибиотик, впервые выделенный в 1952 году и производимый почвенным актиномицетом *Streptomyces erythreus*, первый представитель семейства макролидных антибиотиков, а именно, 14-членных макролидов. Эритромицин представляет собой 14-членное лактонное кольцо со множеством заместителей, два из которых — остатки сахаров, дезозамина и кладинозы (рис. 3.17).

Детали взаимодействия эритромицина с бактериальной рибосомой окончательно прояснились с получением рентгенографической структуры его комплекса с 50S субъединицы бактерии *Deinococcus radiodurans* в 2001 году [154]. Его лактонное кольцо посредством неспецифических гидрофобных взаимодействий встраивается между остатками A2058 и A2059 23S рРНК, расклиная их азотистые основания. Дополнительно, один из заместителей, дезозамин, фиксирует положение антибиотика с помощью водородной связи с A2058. Второй сахарный остаток, кладиноза, согласно структурным данным, довольно свободно располагается в просвете туннеля вдали от остатков рРНК и рибосомных белков. Тем не менее, удаление этого заместителя из структуры макролида предотвращает взаимодействие антибиотика со стоп-пептидом *ermBL* [114]. Если бы это взаимодействие произошло, и трансляция приостановилась бы после синтеза пептида, в результате аттенюации трансляции и изменения третичной структуры мРНК, стал бы доступен стартовый кодон ORF метилтрансферазы *Erm*,

диметилирующей А2058 по экзоциклической аминогруппе и обеспечивающей этим устойчивость к макролидам.

Так вот, производные эритромицина без кладинозы (например, целая группа производных макролидов — кетолиды) не индуцируют трансляцию *erm*-генов и связанную с ними устойчивость. Таким образом, очевидно, что кладиноза во взаимодействии с растущим пептидом аллостерически дезактивирует ПТЦ. Важными для этого взаимодействия, судя по данным биохимических экспериментов, являются остатки G2505 [155] и C2610 [114].

Мы уже упоминали основание Ψ 2580 Н90, находящееся в непосредственной близости от А-сайта, которое разворачивается примерно на 120° при связывании А-тРНК, выпетливаясь из Н90 и меняя парное взаимодействие с G2508 на водородные связи с G2576 и G2582. Этот разворот приводит к смещению прилежащих к Ψ 2580 остатков: G2581, а затем и C2610, который вследствие смещения в сторону РТ теряет свои водородные связи с G2505 (рис. 3.4).

Все вышеописанное происходит при моделировании АР-состояния. Мы взяли кадр рибосомы в АР-состоянии, наиболее близкий к центру основного кластера остатков ПТЦ и РТ, и добавили в него эритромицин согласно структуре комплекса вакантной рибосомы *E. coli* с этим антибиотиком [PDB id: 4V7U]. Полученную новую стартовую систему оптимизировали и рассчитали с ней три траекторий по 200 нс длиной каждая. Для анализа состояния рибосомы с эритромицином использовались финальные 100 нс каждой траектории.

В полученных траекториях остаток кладинозы эритромицина стерически препятствует C2610 занимать то же положение, что и в АР-состоянии — сильно смещенное от парного взаимодействия с G2505 в сторону стэкинг-пары U2609-U1782 (рис. 3.19). Так что C2610 оказывается вынужден сместиться к G2505, что возвращает Ψ 2580 во внутриспиральное РЕ-подобное положение. Разворот Ψ 2580 смещает стопку (в направлении от РТ), напрямую связанную уже с А-спиралью; вследствие этого стопка входит в стерическое противоречие с А76 А-тРНК в каноничном положении, из-за чего вся ССА-стопка тРНК может выйти из общего стэкинга А-спирали, которая после этого релаксируется в т.н. РЕ-состояние.

Правда, выход ССА-конца А-тРНК из сайта происходит не во всех кадрах траекторий с эритромицином, а примерно в половине (хотя переключение основания Ψ 2580 происходило во всех случаях); в значительной части кадров даже поддерживалась водородная связь между потенциальными участниками ПТР

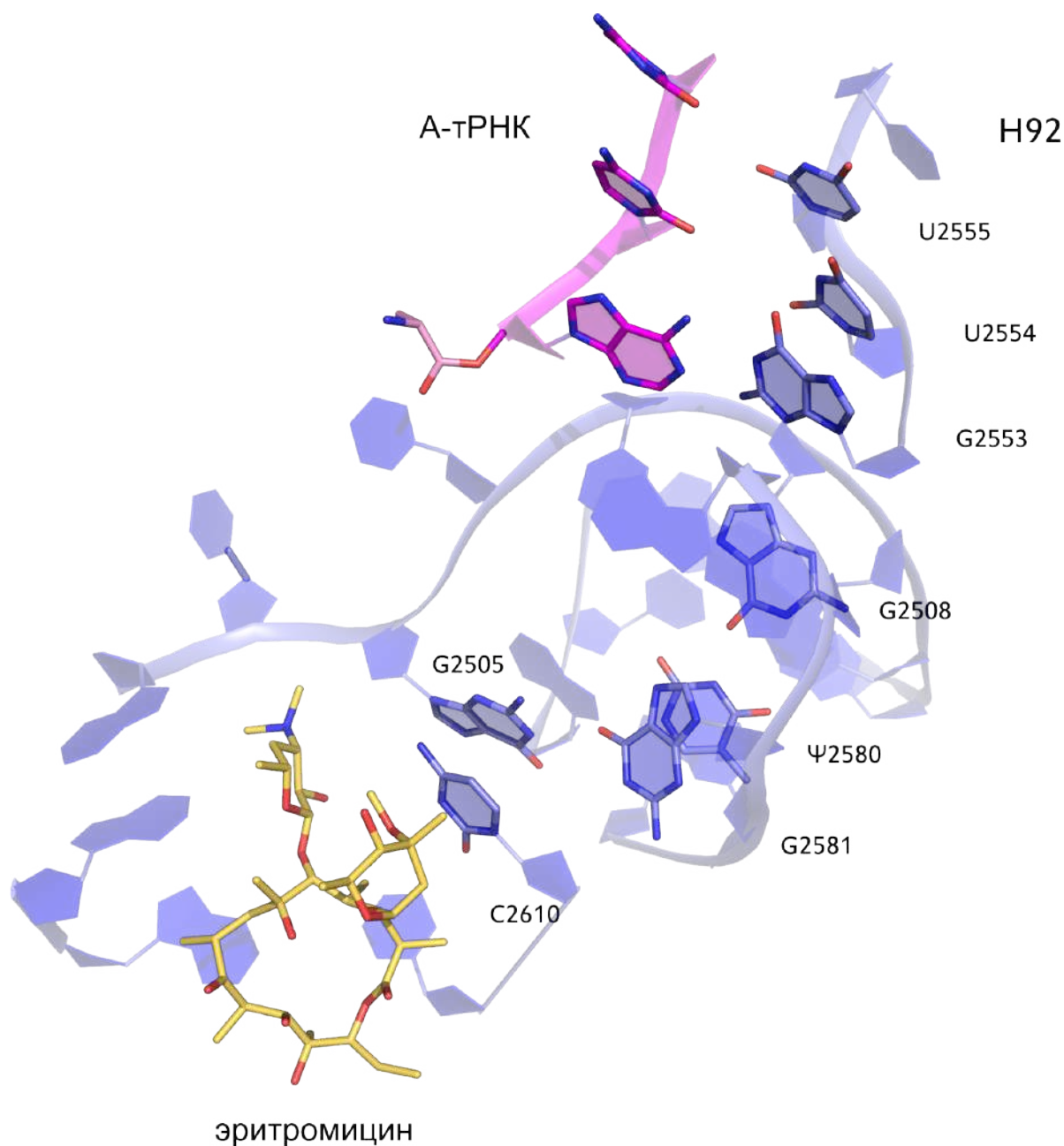


Рис. 3.19. Антибиотик эритромицин в верхней части рибосомного туннеля и конформационные перестройки, вызванные его связыванием с рибосомой в AP-состоянии: возвращение Ψ 2580 во внутриспиральное положение с образованием пары с G2508 и склонность к формированию сплошной стопки оснований G2553-U2554-U2555 с вытеснением тРНК из А-сайта.

(табл. 3.7). Таким образом, в вычислительном эксперименте связывания одного антибиотика не достаточно для полного разобщения реакционных групп, вступающих в ПТР. Вероятно, влияние стерических факторов в рибосомном туннеле усиливается при прохождении вновь синтезированной цепи вдоль по туннелю мимо связавшегося антибиотика.

Влияние связавшегося в РТ эритромицина, как и других аллостерических

Таблица 3.7. Встречаемости нековалентных взаимодействий в молекулярно-динамического моделировании систем рибосомы как в каноническом в AP-состоянии, так с добавлением антибиотиков эритромицина (Ery) и хлорамфеникола (Clm) в сравнении с PE-состоянием. Значения встречаемостей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Взаимодействие	AP- состояние	AP (Ery)	AP (Clm)	PE- состояние
A-сайт				
Ψ 2580/N3-H...G2508/O6	0 \pm 0	89 \pm 9	92 \pm 2	86 \pm 15
G2508/N1-H... Ψ 2580/O4	0 \pm 0	0 \pm 0	24 \pm 4	98.3 \pm 0.7
Ψ 2580/N1-H...G2582/O6	32 \pm 23	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
G2509 Ψ 2580	0 \pm 0	65 \pm 21	16 \pm 10	43 \pm 24
G2505/N2-H...C2610/N3	0 \pm 0	2 \pm 2	26 \pm 37	33 \pm 26
G2505/N1-H...C2610/O2	0 \pm 0	1 \pm 1	20 \pm 29	28 \pm 39
G2582/N2-H...G2553/N3	1 \pm 2	71 \pm 4	47 \pm 25	52 \pm 25
G2553 U2554	0 \pm 0	66 \pm 48	72 \pm 34	96 \pm 3
U2554 U2555	7 \pm 14	61 \pm 44	30 \pm 18	68 \pm 28
(tRNA)C74 U2555	95 \pm 3	38 \pm 52	63 \pm 2	0 \pm 0
H93				
C1941 C1942	89 \pm 7	37 \pm 10	53 \pm 3	0.1 \pm 0.2
C1941 C1965	99 \pm 1	58 \pm 50	51 \pm 67	3 \pm 7
A1937/N6-H...C1934/O2	0 \pm 0	0 \pm 0	27 \pm 24	32 \pm 27
G1964/N2-H...A1937/N1	96 \pm 3	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A1783 A2587	25 \pm 12	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
A1783 G2588	3 \pm 3	11 \pm 9	38 \pm 17	28 \pm 10
Мост В7а и E-сайт				
A1848 a702	0.1 \pm 0.2	37 \pm 22	48 \pm 4	51 \pm 20
A1847 A1848	45 \pm 10	18 \pm 30	0 \pm 0	5 \pm 8
C2073 U2074	99.4 \pm 0.3	33 \pm 12	72 \pm 21	0 \pm 0
A2241/N6-H...G2238/N7	0 \pm 0	26 \pm 46	61 \pm 40	82 \pm 10
G2238/N1-H...G2242/O6	88 \pm 6	61 \pm 53	0 \pm 0	0 \pm 0
G2238/N2-H...U2079/O4	84 \pm 13	49 \pm 43	0 \pm 0	0 \pm 0

факторов, простирается далеко за пределы самого РТ. Например, он восстанавливает мост В7а, характерный для PE-состояния, и так же смещает связи внутри и вокруг спирали H93 (табл. 3.7), что вновь говорит о глобальном характере аллостерических явлений в рибосоме.

3.7.2 Хлорамфеникол в неканонической позе

Получение AP-состояния рибосомы в траекториях молекулярной динамики позволило исследовать вопрос связывания антибиотика иного класса — хлорамфеникола, являющийся родоначальником группы антибиотиков амфениколов (рис. 3.18). Структурные данные комплексов этого антибиотика с вакантной рибосомой достаточно противоречивы: по этим данным хлорамфеникол связывается как минимум в трех

различных сайтах, но, даже если принимать во внимание наиболее распространенный и общепринятый в настоящее время сайт его связывания, в котором формирует стэкинг-взаимодействие между A2451 и C2452, то при занятии aa-тРНК A-сайта, он должен был бы быть вытеснен в силу возникшего стерического конфликта с аминокцильным остатком.

Поэтому был предпринят поиск возможного сайта связывания антибиотика недалеко от ПТЦ методом докинга на фрагменте кадра из траектории рибосомы в AP-состоянии. Найденная наиболее выгодная с точки рассчитанной свободной энергии связывания поза изображена на рис. 3.20, В. В ней хлорамфеникол образует стэкинг-взаимодействия с азотистыми основаниями Ψ 2504 и U2506, а также водородную связь с G2061. Подробно вопрос о соответствии этой позы биохимическим данным рассмотрен нами в [156]. Здесь мы эти вопросы обсуждать не будем, а сразу перейдем к моделированию связывания хлорамфеникола в найденной позе в системе с 70S рибосомой в AP-состоянии.

Как и в случае с эритромицином, были получены по 3 траектории системы с хлорамфениколом по 200 нс длиной, из которых для анализа использовались последние 100 нс.

Воздействие хлорамфеникола на остатки Ψ 2504 и U2506 сказалось и на соединяющем их нуклеотиде G2505, связанным с переключающимся остатком Ψ 2580. Связывание хлорамфеникола точно так же возвращало псевдоуридин Ψ 2580 во внутриспиральное положение, характерное для PE-состояния. Это положение способствовало возвращению в PE-подобное состояние и A-спирали, правда, снова лишь в части кадров траектории (табл. 3.7).

Разумеется, рано судить о воздействии антибиотиков на A-сайт до изучения их взаимодействия в туннеле с различными стоп-пептидами, чье дополнительное действие полностью предотвращает ПТР, или же, напротив, с факторами, отменяющими антагонизм антибиотиков и ПТР. Полученные на данном этапе результаты уже свидетельствуют в пользу универсального характера найденного механизма переключения A-спирали между “открытым” и “закрытым” состояниями. Впрочем, немаловажно будет добавить в рассмотрение хотя бы один фактор противоположного действия, например, модификацию, вызывающую устойчивость бактериальных организмов к действию антибиотиков.

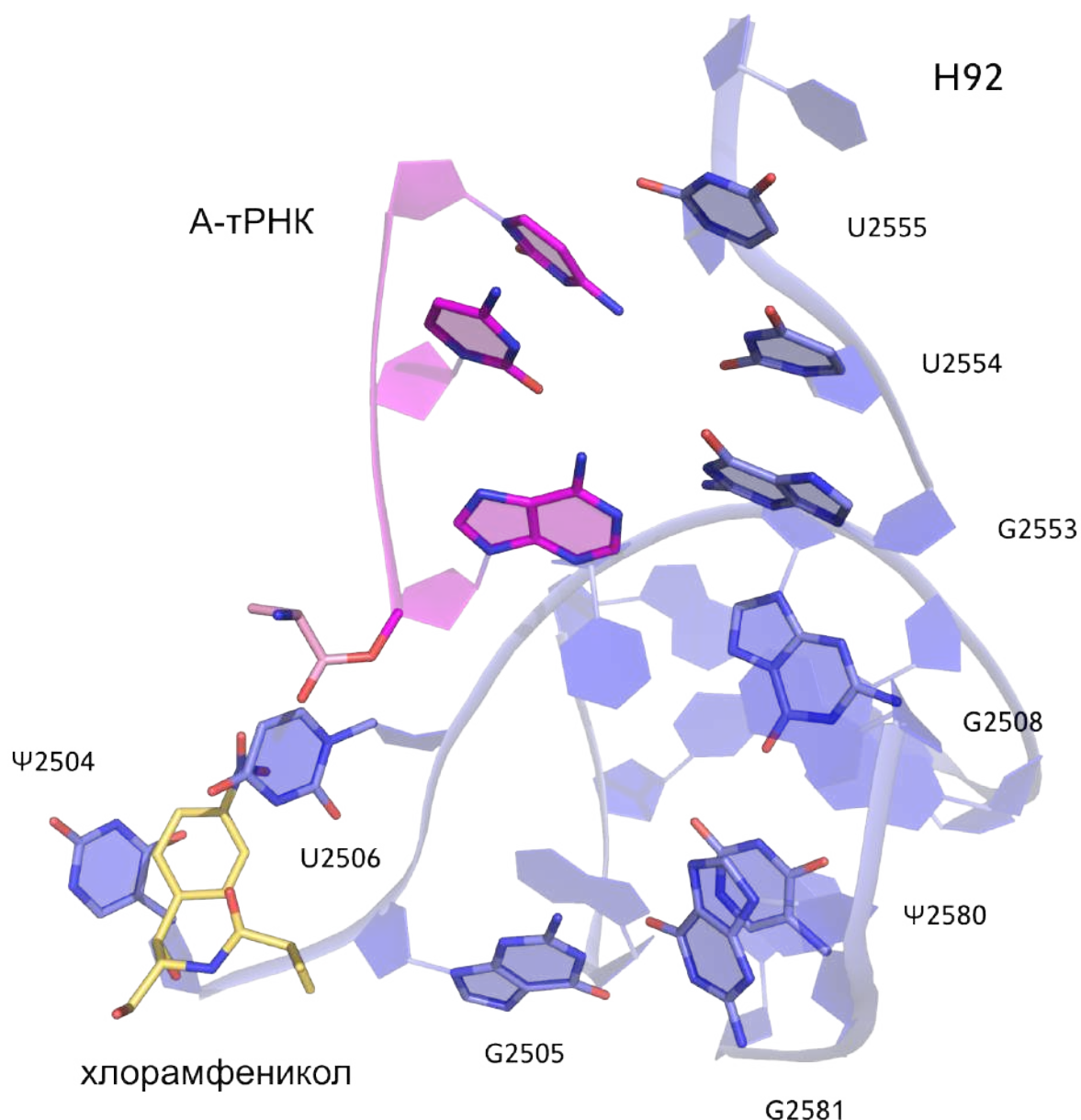


Рис. 3.20. Антибиотик хлорамфеникол недалеко от ПТЦ в неканоническом сайте, найденном методами докинга и молекулярной динамики, и конформационные перестройки, вызванные его связыванием с рибосомой в AP-состоянии: возвращение Ψ2580 во внутриспиральное положение с образованием пары с G2508 и склонность к формированию сплошной стопки оснований G2553-U2554-U2555 с вытеснением тРНК из А-сайта.

3.7.3 Заключение

Методом молекулярно-динамического моделирования в бактериальной рибосоме были обнаружены согласованные переключения, регулирующие возможность связать тРНК в А- или Е-сайтах, которые затрагивают значительную часть рРНК обеих субъединиц рибосомы и ряд межсубъединичных мостов. В случае А-тРНК, правильная геометрия ее связывания необходима для сближения субстратов ПТР и их фиксирования друг относительно друга, что является предпосылкой к катализу

реакции транспептидации. Различные же аллостерические антагонисты, будь то мутации в рРНК, Е-тРНК или эритромицин, согласно данным молекулярно-динамического моделирования, переводят А-сайт большой субъединицы в состояние, усложняющее ПТР, и делают это за счет во многом схожих перераспределений нековалентных взаимодействий остатков рРНК. В целом, результаты молекулярной динамики находятся в полном согласии с экспериментальными данными и позволяют выйти на новый уровень интерпретации оных.

С учетом хорошей согласуемости полученных результатов с известными ранее экспериментальными данными, при рациональном дизайне новых антибиотиков необходимо учитывать разницу между AP и PE состояниями, зачастую неразличимую структурными методами, и проектировать антибиотики, не просто максимизируя их сродство к структуре рибосомы, но и их способность смещать рибосому из канонического AP-состояния.

Глава 4

Методы

4.1 Моделируемая система

Все моделируемые в этом исследовании системы комплексов рибосомы *E. coli* были получены на базе одной структуры (код PDB: 5AFI) с разрешением 2,9Å [157]. Эта структура представляет собой рибосому в преадаккомодационном состоянии, содержащую деацелированную E-тРНК^{fMet}, fMet-P-tRNA^{fMet} и Phe-A/T-тРНК^{Phe} в составе тройного комплекса с фактором элонгации Tu, GTP и антибиотиком кирромицином, фиксирующим претранслокационное положение.

Недостающие модифицированные основания рРНК и тРНК были добавлены вручную в соответствии со сведениями из банка данных [158]. Положения модифицированных оснований были оптимизированы минимизацией энергии сочетанием метода наискорейшего спуска с алгоритмом Бройдена-Флетчера-Гольдфарба-Шанно с ограниченным использованием памяти [159] (в дальнейшем применение этого метода обозначается просто как “оптимизация”).

Общий протокол оптимизации систем был подобран так, чтобы тРНК, как присутствовавшие в исходных структурных данных, так и добавленные из других структур рибосомных комплексов, стабильно и воспроизводимо сохраняли нековалентные взаимодействия с рибосомой. Подготовка систем к молекулярно-динамическому моделированию велась в следующей последовательности:

- Добавление недостающих фрагментов: белка L1, нуклеотидов 883-893 23S рРНК — из другой структуры рибосомы *E. coli* (код PDB: 4V7D); замена неверно распознанных остатков G1847 и m⁵C747 на A1847 и m⁵U747, соответственно; смена состава тРНК и удаление ненужных лигандов (EF-Tu, кирромицин и

др.); оптимизация добавленных фрагментов в вакууме при фиксации координат атомов остальных частей системы.

- Добавление 3515-3517 ионов K^+ с Ван-дер-Ваальсовыми параметрами, оптимизированными для использования вместе с моделью воды TIP4P_{ew} [149] для нейтрализации отрицательного заряда системы; ионы калия встраивались в области повышенной концентрации отрицательного заряда [160].
- Оптимизация ионов K^+ в вакууме при замороженных прочих атомах (включая ионы Mg^{2+} , разрешенные в исходной структуре). Оптимизация ионов калия в вакууме позволяла максимально уменьшить возможные дипольные моменты между отрицательно заряженными группами и противоионами за счет сближения противоположных зарядов до добавления снижающих диэлектрическую проницаемость среды молекул воды.
- Добавление растворителя в систему с помощью программы `solvate` пакета Gromacs. Ячейка размерами $24 \times 27 \times 25$ нм содержала в себе около 2,02 млн. атомов и не менее чем $1,5 \text{ \AA}$ слой чистого растворителя, прилегающего к каждой из граней.
- Добавление ионов в таком количестве, чтобы создать концентрацию KCl в 100 мМ и $MgCl_2$ в 6 мМ. Всего было добавлено 59 ионов магния, 975 ионов калия и 1093 аниона хлора.
- Оптимизация растворителя и ионов расчетом короткой молекулярной динамики протяженностью 5 нс при наложении позиционных ограничений с константой жёсткости $1000 \text{ кДж/моль} \cdot \text{нм}^2$ на все тяжелые атомы системы (т. е. все, кроме атомов водорода). Все дальнейшие позиционные и дистанционные ограничения имели ту же константу.
- Оптимизация, если требовалось, А-тРНК, которая была взята из структуры PDB id:4WPO рибосомы *T. thermophilus* и встроена в систему наложением структур по 23S рРНК. Эта оптимизация осуществлялась расчетом 2 нс молекулярной динамики при наложении позиционных ограничений на все тяжелые атомы рибосомы, за исключением остатков, расположенных в пределах 5 \AA от тРНК: для них позиционные ограничения налагались лишь на C_α -атом аминокислотного или атом фосфора нуклеотидного остатка. А-тРНК

при этом никак позиционно не ограничивалась, однако, атомы доноров и акцепторов уотсон–криковских водородных связей кодона и антикодона были соединены дистанционными ограничениями с равновесным расстоянием в 3Å ; исходные расстояния между ними же, установившиеся в результате структурного выравнивания, не превышали $4,5\text{Å}$, и водородные связи устанавливались в течение первых 100 пс.

- Оптимизация конформаций боковых групп аминокислотных и нуклеотидных остатков комплекса коротким расчетом молекулярной динамики, в котором позиционные ограничения налагались лишь на один атом в остатке, так, как это было описано выше. Оптимизационную динамику проводили 2 нс до исчерпания быстрого роста RMSD.
- Оптимизация мРНК, тРНК и протуберанцев рибосомы (белка L1 и остатков 2093-2196 23S рРНК протуберанца L1 и белков L10 и L11 вкупе с остатками 1028-1126 23S рРНК протуберанца L7/L12) как наиболее подвижных элементов рибонуклеопротеинового комплекса. Для этого была рассчитана короткая динамика с одноатомными ограничениями на всех остатках рибосомы, кроме оптимизируемых фрагментов. Расчет динамики проводили до стабилизации их RMSD, что обычно занимало 5-7 нс.

Полученные таким образом системы рибосомного комплекса в AP- и PE-состоянии использовались для расчета 4 траекторий молекулярной динамики по 200 нс каждая. Потенциальная энергия и RMSD систем стабилизировались в пределах первых 100 нс расчетов (рис. 3.1 и рис. 3.2, А и В).

Для проверки полученных результатов первых расчетов на стабильность и воспроизводимость для каждой из систем на основе объединенных данных конечных 100 нс всех траекторий был получен основной кластер для остатков, составляющих 5Å окрестность ПТЦ, а также выстилающих внутреннюю поверхность РТ. Кадр из объединенных траекторий с наименьшим среднеквадратичным отклонением от центра этого кластера служил исходной структурой для дальнейшей оптимизации. Эта структура была подвергнута 30 циклам оптимизации, состоявших из расчета равновесной молекулярной динамики протяжённостью 40 пс при температуре 20К с последующей оптимизацией потенциальной энергии системы методом сопряжённых градиентов по Полаку–Райберу. При этом критерием останова оптимизации энергии

служило падение максимальной силы на атомах системы ниже 1 кДж/моль*нм. После такой обработки структуры AP- и PE-состояний были нагреты с 20К до 310К в течение 2,5 нс. Исходя из полученного при этом состояния системы равновесным молекулярно-динамическим моделированием при 310К был получен еще один набор в 4 траектории длиной 200 нс на каждую систему. В результате повторного расчета RMSD систем также стабилизировалось в пределах первых 100 нс траекторий, а вот потенциальная энергия менялась слабо с самого старта (рис. 3.1 и рис. 3.2, C и D).

Аналогичный кадр-центроид был извлечен из полученных траекторий как основа для стартовой системы с добавлением модификаций: мутаций, пептидов, антибиотиков.

За внедрением мутации A2531U последовала оптимизация геометрии измененного остатка и короткая молекулярная динамика области на стыке H91 и H95 с одноатомными позиционными ограничениями всей остальной системы.

Замена двух уридинов на цитидин при введении мутации UU2492-3C потребовала двух дополнительных коротких расчетов молекулярной динамики длиной 2 нс каждый: первый – для оптимизации положения C2492, второй – для оптимизации положения спирали H89 при наложении на остальные элементы комплекса одноатомных позиционных ограничений.

Положение вновь синтезированных пептидов fMFT И fMRFFR в рибосомном туннеле было определено как наиболее энергетически выгодный результат докинга пептида, закрепленного с C-конца на неподвижном фрагменте Р-тРНК. Мишень для докинга была вырезана из PE системы так, чтобы вмещать весь просвет рибосомного туннеля и ПТЦ; ее размер составлял 8 × 8 × 8 нм, а из ионов присутствовали только Mg²⁺. После добавления в систему пептида в соответствующей конформации была рассчитана 2 нс молекулярная динамика с позиционными ограничениями на один атом каждого остатка, исключая вновь введенный пептид.

Аналогичная система использовалась для докинга хлорамфеникола в рибосоме.

4.2 Условия докинга и молекулярно-динамического моделирования

Моделирование молекулярной динамики проводилось с помощью пакета GROMACS 5.1.4 [161; 162] и силового поля AMBER-ff14SB. Топологии для антибио-

тиков эритромицина и хлорамфеникола были получены в силовом поле GAFF [163]. Оптимизация геометрии и молекулярных электростатических потенциалов вновь параметризуемых остатков и молекул получались квантово-химическими расчетами методом Хартри-Фока с базисом 6-31G* в пакетах FIREFLY [164; 165] и ПРИРОДА [166; 167]. Точечные заряды атомов были определены согласно модели RESP [168].

Моделирование систем рибосомы осуществлялось при температуре 310K (температурный оптимум для *E. coli*) с периодом привязки 0,1 пс с термостатом масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [169] и при периодических граничных условиях во всех трех измерениях с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена [170] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались с применением метода сети частиц Эвальда [171] с четвертым порядком интерполяции и шагом сетки в 0,125 нм. Шаг интегрирования уравнений движения по времени составлял 2 фс. Для контроля длин ковалентных связей, в которых участвуют атомы водорода, использовался алгоритм LINCS [172].

Докинг пептидов в рибосомном туннеле осуществлялся с помощью программы rDock с шагом сеток поверхности полости и дисперсионных взаимодействий 0,25 нм и 1000 запусками процесса глобальной оптимизации.

4.3 Методы анализа траекторий

Для анализа использовались последние 100 из 200 нс каждой траектории. В них вычислялись встречаемости нековалентных взаимодействий: водородных связей и стэкинг-взаимодействий — как отношение количества кадров траектории, в которых взаимодействие есть, к количеству всех кадров исследуемого участка. Наличие взаимодействия в конкретном кадре определялось исходя из геометрических параметров. Для водородной связи использовалась утилита `hbond` пакета Gromacs с параметрами обнаружения водородных связей по умолчанию:

- атом-донор водорода и атом-акцептор разделены расстоянием не более 3,5Å,
- угол водород-донор-акцептор меньше 30°

Для выявления стэкинг-взаимодействий определялся центр азотистого основания (среднее арифметическое координат атомов C2, C4 и C6 для пиримидинов и N1, N3 и

C8 для пуринов) и его плоскость — по этим трем точкам. Стэкинг-взаимодействие в кадре учитывалось, если:

1. расстояние между центрами не превышало 5,5 Å,
2. угол между плоскостями азотистых оснований не превышал 30°,
3. угол между плоскостью первого азотистого основания и отрезком, соединяющим геометрические центры составляет как минимум 45°; без этого условия компланарная пара оснований (например, уотсон-криковская) была бы ошибочно распознана как пара в стэкинг-взаимодействии.

Величина встречаемости связи для каждого функционального состояния рибосомы описывалась средним значением и среднеквадратичным отклонением, вычисленными по всем стабильным участкам траекторий одной и той же системы.

Для поиска возможных аллостерических путей внутри рибосомы был построен граф связности между остатками рРНК. Связи боковых групп аминокислот также принимались во внимание, их учет не добавил ничего принципиально нового в картину потенциальных путей передачи аллостерического сигнала, что не удивительно, поскольку:

1. делеция большинства рибосомных белков не приводит к потере функциональности рибосомы [31],
2. основные функции рибосомы осуществляют ее рРНК, роль белков заключается в усилении точности и производительности [35].

В полном графе взаимодействий остаток рРНК представлялся как вершина, и связь между вершинами проводилась, если остатки образовывали хотя бы одну водородную связь или стэкинг-взаимодействие со встречаемостью не ниже 20% с достоверностью в 95% хотя бы в одном из изучаемых состояний. Визуализировался этот граф в трехмерном пространстве с помощью программы PyMol: вершины графа (остатки) отображались координатами C4'-атомов нуклеотидных остатков, соединенными связями между собой сообразно графу связности.

Самый крупный связный кластер в этой системе при этом объединял подавляющее большинство (более 90%) всех остатков всех трех рРНК. Хотя трехмерная визуализация сама по себе делает очевидными некоторые кратчайшие аллостерические

пути, в некоторых случаях приходилось прибегать к процедуре отсечения боковых ветвей. Выглядела она следующим образом:

1. назначаются начальные и конечные точки — остатки, между которыми мы хотим выявить возможный аллостерический путь; условно обозначим их как остатки А и В
2. для каждого остатка — вершины X — из всего связного графа алгоритмом Флойда–Уоршелла рассчитывается кратчайший путь как до начального остатка А, так и до конечного В; если путь из X в А и путь из X в В хотя бы частично совпадают, то точка X признается лежащей на побочной ветви
3. из оставшихся, невыбывших точек выделяется только связный кластер, содержащий А и В точки; этот кластер содержит все полностью альтернативные пути из А в В; частично–альтернативные отображаются в других связных кластерах из остатков, не отброшенных в предыдущем пункте.

Этот алгоритм, как и другие скрипты для обработки данных, был реализован на Python 2.7.

Как правило, в результатах изложены наблюдения, затрагивающие только полностью альтернативные пути, и именно их в тексте именуют “кратчайшими путями” или просто “путями”.

Консервативность остатков рРНК оценивалась согласно данным базы выровненных последовательностей рРНК SILVA [173]. При этом консервативность (универсальная ли или внутри одного царства) рассматривалась как встречаемость основания не менее чем в 99% случаев (оставшиеся доли процента, помимо прочего, могут относиться на счет ошибок выравнивания, которые в этой базе данных есть). Для анализа файла последовательностей рРНК был написан скрипт на Python 2.7.

Глава 5

Выводы

1. Полученная молекулярно–динамическая модель хорошо согласуется с известными экспериментальными данными.
2. Антагонизм между А– и Е–сайтами большой субъединицы рибосомы осуществляется, главным образом, через воздействие, передающееся от С75 Е–тРНК на Н93, имеющую связи как с ПТЦ, так и с А–спиралью.
3. А–сайт большой субъединицы рибосомы имеет “открытую” конформацию с выпетливанием Ψ_{2580} по направлению к РТ и “закрытую”, в которой образование стэкинг–взаимодействий G2553-U2554-U2555 препятствует связыванию тРНК.
4. Межсубъединичные мосты В7а, В2а/d и В3 связаны с состоянием А–сайта и участвуют в его регуляции.
5. Переключение А–сайта между обнаруженными “открытой” и “закрытой” конформациями имеет универсальный характер, и, скорее всего, играет ключевую роль в остановке ПТР различными аллостерическими регуляторами.

Благодарности

Автор выражает благодарность НИВЦ МГУ за обеспечение возможности расчетов молекулярной динамики на суперкомпьютере “Ломоносов”.

Автор благодарит ФГАОУ ВО “ЮУрГУ (НИУ)” и проект “Наука будущего” (ГЗ 4.1175.2017/ПЧ) за финансовую поддержку в выполнении данной научной работы.

Автор также благодарит д.х.н., профессора факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова Головина Андрея Викторовича за предоставленную инфраструктуру для хранения данных.

Список литературы

1. *Schmeing T., Ramakrishnan V.* What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation // *Nature*. — 2009. — Vol. 461. — P. 1234–1242.
2. *Steitz T. M.* A structural understanding of the dynamic ribosome machine // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2008. — Vol. 9. — P. 242–253.
3. *Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Tarry M. J., Carter A. P., Ramakrishnan V.* Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit // *Science*. — 2001. — Vol. 292, No. 5518. — P. 897–902.
4. *Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P., Steitz T.* The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis // *Science*. — 2000. — Vol. 289. — P. 920–930.
5. *Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P., Steitz T.* The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4Å resolution // *Science*. — 2000. — Vol. 289. — P. 905–920.
6. *Polikanov Y., Steitz T., Innis C.* A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide bond formation on the ribosome // *Nature Struct. Mol. Biol.* — 2014. — Vol. 21. — P. 787–793.
7. *Beringer M., Rodnina M. V.* The ribosomal peptidyl transferase // *Mol. Cell*. — 2007. — Vol. 26, No. 3. — P. 311–321.
8. *Jenni S., Ban N.* The chemistry of protein synthesis and voyage through the ribosomal tunnel // *Cur. Opin. Struct. Biol.* — 2003. — Vol. 13. — P. 212–219.
9. *Kramer G., Boehringer D., Ban N., Bukau B.* The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 16. — P. 589–597.

10. *Yonath A., Mussig J., Tesche B., Lorenz S., Erdmann V., Wittmann H.* Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus* // *Biochem. Int.* — 1980. — Vol. 1, No. 5. — P. 428–435.
11. *Ban N., Freeborn B., Nissen P., Penczek P., Grassucci R., Sweet R., Frank J., Moore P., Steitz T.* A 9Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit // *Cell.* — 1998. — Vol. 93. — P. 1105–1115.
12. *Yusupov M., Yusupova G., Baucom A., Lieberman K., Earnest T., Cate J., Noller H.* Crystal structure of the ribosome at 5.5Å resolution // *Science.* — 2001. — Vol. 292. — P. 883–896.
13. *Jacq B.* Sequence homologies between eukaryotic 5.8S rRNA and the 5'-end of prokaryotic 23S rRNA: evidences for a common evolutionary origin // *Nucleic Acids Res.* — 1981. — Vol. 9, No. 12. — P. 2913–2932.
14. *Wilson D. N., Doudna Cate J. H.* The structure and function of the eukaryotic ribosome // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2012. — Vol. 4, No. 5. — a011536–a011536.
15. *Johnston I. G., Williams B. P.* Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention // *Cell Syst.* — 2016. — Vol. 2, No. 2. — P. 101–111.
16. *Greber B. J., Ban N.* Structure and function of the mitochondrial ribosome // *Annu. Rev. Biochem.* — 2016. — Vol. 85, No. 1. — P. 103–132.
17. *Achenbach J., Nierhaus K. H.* Translocation at work // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2013. — Vol. 20. — P. 1019–1022.
18. *Ogle J. M., Ramakrishnan V.* Structural insights into translational fidelity // *Annu. Rev. Biochem.* — 2005. — Vol. 74, No. 1. — P. 129–177.
19. *Budkevich T., Giesebrecht J., Altman R. B., Munro J. B., Mielke T., Nierhaus K. H., Blanchard S. C., Spahn C. M.* Structure and dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex // *Mol. Cell.* — 2011. — Vol. 44, No. 2. — P. 214–224.
20. *Klein D. J.* The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit // *RNA.* — 2004. — Vol. 10, No. 9. — P. 1366–1379.

21. *Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vonnrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V.* Structure of the 30S ribosomal subunit // *Nature*. — 2000. — Vol. 407, No. 6802. — P. 327–339.
22. *Nissen P., Ippolito J., Ban N., Moore P., Steitz T.* RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif // *PNAS*. — 2001. — Vol. 98, No. 9. — P. 4899–4903.
23. *Noller H. F.* RNA structure: reading the ribosome // *Science*. — 2005. — Vol. 309, No. 5740. — P. 1508–1514.
24. *Steinberg S. V., Boutorine Y. I.* G-ribo: A new structural motif in ribosomal RNA // *RNA*. — 2007. — Vol. 13, No. 4. — P. 549–554.
25. *Brodersen D. E., Clemons W. M., Carter A. P., Wimberly B. T., Ramakrishnan V.* Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA // *J. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 316, No. 3. — P. 725–768.
26. *Klein D., Moore P., Steitz T.* The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit // *J. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 340, No. 1. — P. 141–177.
27. *Ciriello G., Gallina C., Guerra C.* Analysis of interactions between ribosomal proteins and RNA structural motifs // *BMC Bioinformatics*. — 2010. — Vol. 11, No. S1. — S41.
28. *Klein D.* The kink-turn: a new RNA secondary structure motif // *EMBO J.* — 2001. — Vol. 20, No. 15. — P. 4214–4221.
29. *Dabbs E. R.* Mutational alterations in 50 proteins of the *Escherichia coli* ribosome // *Mol. Gen. Genet.* — 1978. — Vol. 165, No. 1. — P. 73–78.
30. *Dabbs E.* Mutants lacking individual ribosomal proteins as a tool to investigate ribosomal properties // *Biochimie*. — 1991. — Vol. 73, No. 6. — P. 639–645.
31. *Yamamoto H., Pech M., Wittek D., Moll I., Nierhaus K. H.* The Minimal Ribosome / ed. by P. L. Luisi, C. Chiarabelli. — Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2011. — P. 227–245.
32. *Hampl H., Schulze H., Nierhaus K. H.* Ribosomal components from *Escherichia coli* 50S subunits involved in the reconstitution of peptidyltransferase activity // *J. Biol. Chem.* — 1981. — Vol. 256, No. S1. — P. 2284–2288.

33. *Schulze H., Nierhaus K.* Minimal set of ribosomal components for reconstitution of the peptidyltransferase activity. // *EMBO J.* — 1982. — Vol. 1, No. 5. — P. 609–613.
34. *Noller H., Hoffarth V., Zimniak L.* Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures // *Science.* — 1992. — Vol. 256, No. 5062. — P. 1416–1419.
35. *Noller H. F.* Evolution of protein synthesis from an RNA world // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2012. — Vol. 4, No. 4. — a003681–a003681.
36. *Anderson R. M., Kwon M., Strobel S. A.* Toward ribosomal RNA catalytic activity in the absence of protein // *J. Mol. Evol.* — 2007. — Vol. 64, No. 4. — P. 472–483.
37. *Zhang B., Cech T. R.* Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes // *Nature.* — 1997. — Vol. 390, No. 6655. — P. 96–100.
38. *Zhang B., Cech T. R.* Peptidyl-transferase ribozymes: trans reactions, structural characterization and ribosomal RNA-like features // *Chem. Biol.* — 1998. — Vol. 5, No. 10. — P. 539–553.
39. *Sun L., Cui Z., Gottlieb R. L., Zhang B.* A selected ribozyme catalyzing diverse dipeptide synthesis // *Chem. Biol.* — 2002. — Vol. 9, No. 5. — P. 619–628.
40. *Bokov K., Steinberg S. V.* A hierarchical model for evolution of 23S ribosomal RNA // *Nature.* — 2009. — Vol. 457, No. 7232. — P. 977–980.
41. *Agmon I., Bashan A., Zarivach R., Yonath A.* Symmetry at the active site of the ribosome: structural and functional implications // *Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 386, No. 9. — P. 833–844.
42. *Kaberdina A. C., Szaflarski W., Nierhaus K. H., Moll I.* An unexpected type of ribosomes induced by kasugamycin: a look into ancestral times of protein synthesis? // *Mol. Cell.* — 2009. — Vol. 33, No. 2. — P. 227–236.
43. *Mears J. A., Cannone J. J., Stagg S. M., Gutell R. R., Agrawal R. K., Harvey S. C.* Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis // *J. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 321, No. 2. — P. 215–234.
44. *Changeux J. P.* 50 years of allosteric interactions: the twists and turns of the models // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* — 2013. — Vol. 14. — P. 819–829.

45. *Cornish-Bowden A.* Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes // FEBS J. — 2014. — Vol. 281. — P. 621–632.
46. *Kleckner I. R., Gollnick P., Foster M. P.* Mechanisms of allosteric gene regulation by NMR quantification of μ s-ms protein dynamics // J. Mol. Biol. — 2012. — Vol. 415. — P. 372–381.
47. *Stower H.* Gene regulation: allosteric effects // Nat. Rev. Genet. — 2013. — Vol. 14. — P. 238.
48. *Cecchini M., Changeux J. P.* The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: structure, conformational transitions and allosteric modulation // Neuropharmacology. — 2015. — Vol. 96. — P. 137–149.
49. *Kim S., Brostromer E., Xing D., Jin J., Chong S., Ge H., Wang S., Gu C., Yang L., Gao Y. Q., Su X., Sun Y., Xie X. S.* Probing allostery through DNA // Science. — 2013. — Vol. 339. — P. 816–819.
50. *Chen I.* Allostery through DNA // Nat. Struct. Mol. Biol. — 2013. — Vol. 20. — P. 410.
51. *Soukup G. A.* Aptamers meet allostery // Chem. Biol. — 2004. — Vol. 11. — P. 1031–1032.
52. *Goodey N. M., Benkovic S. J.* Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route // Nat. Chem. Biol. — 2008. — Vol. 4. — P. 474–482.
53. *Monod J., Wyman J., Changeux J.-P.* On the nature of allosteric transitions: a plausible model // J. Mol. Biol. — 1965. — Vol. 12. — P. 88–118.
54. *Koshland D. E., Nemethy G., Filmer D.* Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits // Biochemistry. — 1966. — Vol. 5. — P. 365–385.
55. *Saibil H. R., Fenton W. A., Clare D. K., Horwich A. L.* Structure and allostery of the chaperonin GroEL // J. Mol. Biol. — 2013. — Vol. 425. — P. 1476–1487.
56. *Hilser V. J., Wrabl J. O., Motlagh H. N.* Structural and energetic basis of allostery // Ann. Rev. Biophys. — 2012. — Vol. 41. — P. 585–609.
57. *Hol T. C., Cox M. B., Bryant H. U., Draper M. W.* Selective estrogen receptor modulators and postmenopausal women's health // J. Womens Health. — 1997. — Vol. 6. — P. 523–531.

58. *Katzenellenbogen B. S., Montano M. M., Ekena K., Herman M. E., McInerney E. M.* Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* — 1997. — Vol. 44. — P. 23–38.
59. *Gunasekaran K., Ma B., Nussinov R.* Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? // *Proteins.* — 2004. — Vol. 57. — P. 433–443.
60. *Tsai C.-J., Nussinov R.* A unified view of "How allostery works" // *PLoS Comput. Biol.* — 2014. — Vol. 10, No. 2. — e1003394.
61. *Feher V. A., Durrant J., Van Wart A. T., Amaro R. E.* Computational approaches to mapping allosteric pathways // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 2014. — Vol. 25. — P. 98–103.
62. *Holliday M. J., Camilloni C., Armstrong G. S., Vendruscolo M., Eisenmesser E. Z.* Networks of dynamic allostery regulate enzyme function // *Structure.* — 2017. — Vol. 25. — P. 276–286.
63. *Daily M. D., Gray J. J.* Allosteric communication occurs via networks of tertiary and quaternary motions in proteins // *PLoS Comput. Biol.* — 2009. — Vol. 5. — e1000293.
64. *Tsai C. J., Del Sol A., Nussinov R.* Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play // *J. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 378. — P. 1–11.
65. *Cooper A., Dryden D. T. F.* Allostery without conformational change. a plausible model // *Eur. Biophys. J.* — 1984. — Vol. 11. — P. 103–109.
66. *Panjikovich A., Daura X.* Exploiting protein flexibility to predict the location of allosteric sites // *BMC Bioinformatics.* — 2012. — Vol. 13. — P. 273.
67. *Chan Y. L., Dresios J., Wool I. G.* A pathway for the transmission of allosteric signals in the ribosome through a network of RNA tertiary interactions // *J. Mol. Biol.* — 2006. — Vol. 355. — P. 1014–1025.
68. *Burakovsky D. E., Sergiev P. V., Steblyanko M. A., Konevega A. L., Bogdanov A. A., Dontsova O. A.* The structure of helix 89 of 23S rRNA is important for peptidyl transferase function of Escherichia coli ribosome // *FEBS Lett.* — 2011. — Vol. 585. — P. 3073–3078.
69. *Rheinberger H. J., Sternbach H., Nierhaus K. H.* Codon-anticodon interaction at the ribosomal E site // *J. Biol. Chem.* — 1986. — Vol. 261. — P. 9140–9143.

70. *Gnirke A., Geigenmuller U., Rheinberger H. J., Nierhaus K. H.* The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. analysis with a heteropolymeric mRNA // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264. — P. 7291–7301.
71. *Nierhaus K. H.* The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future // *Biochemistry.* — 1990. — Vol. 29. — P. 4997–5008.
72. *Marquez V., Wilson D. N., Tate W. P., Triana-Alonso F., Nierhaus K. H.* Maintaining the ribosomal reading frame: the influence of the E site during translational regulation of release factor 2 // *Cell.* — 2004. — Vol. 118. — P. 45–55.
73. *Geigenmuller U., Nierhaus K. H.* Significance of the third tRNA binding site, the E site, on *E. coli* ribosomes for the accuracy of translation: an occupied E site prevents the binding of non-cognate aminoacyl-tRNA to the A site // *EMBO J.* — 1990. — Vol. 9. — P. 4527–4533.
74. *Di Giacco V., Marquez V., Qin Y., Pech M., Triana-Alonso F. J., Wilson D. N., Nierhaus K. H.* Shine-dalgarno interaction prevents incorporation of noncognate amino acids at the codon following the AUG // *PNAS.* — 2008. — Vol. 105. — P. 10715–10720.
75. *Nierhaus K. H.* Decoding errors and the involvement of the E-site // *Biochimie.* — 2006. — Vol. 88. — P. 1013–1019.
76. *Leger M., Dulude D., Steinberg S. V., Brakier-Gingras L.* The three transfer RNAs occupying the A, P, and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — Vol. 35. — P. 5581–5592.
77. *Liao P. Y., Gupta P., Petrov A. N., Dinman J. D., Lee K. H.* A new kinetic model reveals the synergistic effect of E-, P- and A-sites on -1 ribosomal frameshifting // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — Vol. 36. — P. 2619–2629.
78. *Semenkov Y. P., Rodnina M. V., Wintermeyer W.* The "allosteric three-site model" of elongation cannot be confirmed in a well-defined ribosome system from *Escherichia coli* // *PNAS.* — 1996. — Vol. 93. — P. 12183–12188.
79. *Voorhees R. M., Ramakrishnan V.* Structural basis of the translational elongation cycle // *Annu. Rev. Biochem.* — 2013. — Vol. 82. — P. 203–236.
80. *Chen C., Stevens B., Kaur J., Smilansky Z., Cooperma B. S., Goldman Y. E.* Allosteric vs. spontaneous exit-site (E-site) tRNA dissociation early in protein synthesis // *PNAS.* — 2011. — Vol. 108. — P. 16980–16985.

81. *Schmeig T. M., Moore P. B., Steitz T. A.* Structures of deacylated tRNA mimics bound to the E site of the large ribosomal subunit // *RNA*. — 2003. — Vol. 9. — P. 1345–1352.
82. *Rakauskaite R., Dinman J. D.* rRNA mutants in the yeast peptidyltransferase center reveal allosteric information networks and mechanisms of drug resistance // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — Vol. 36. — P. 1497–1507.
83. *Schmeing T. M., Voorhees R. M., Kelley A. C., Yong-Gui G., Murphy F. V., Weir J. R., Ramakrishnan V.* The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA // *Science*. — 2009. — Vol. 326. — P. 688–694.
84. *Schmeing T. M., Voorhees R. M., Kelley A. C., Ramakrishnan V.* How mutations in tRNA distant from the anticodon affect the fidelity of decoding // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2011. — Vol. 18. — P. 432–436.
85. *Hirsh D.* Tryptophan tRNA of *Escherichia coli* // *Nature*. — 1970. — Vol. 228. — P. 57.
86. *Ogle J., Murphy F., Tarry M., V. R.* Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form // *Cell*. — 2002. — Vol. 111. — P. 721–732.
87. *Lodmell J. S., Dahlberg A. E.* A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA // *Science*. — 1997. — Vol. 277. — P. 1262–1267.
88. *Kamath D., Gregory S. T., O'Connor M.* The loop 2 region of ribosomal protein uS5 influences spectinomycin sensitivity, translational fidelity, and ribosome biogenesis // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2017. — Vol. 61. — e01186–16.
89. *Kamath D., Allgeyer B. B., Gregory S. T., Bielski M. C., Roelofs D. M., Sabapathypillai S. L., Vaid N., O'Connor M.* The C-terminus of ribosomal protein uS4 contributes to small ribosomal subunit biogenesis and the fidelity of translation // *Biochimie*. — 2017. — Vol. 138. — P. 194–201.
90. *Liu Q., Fredrick K.* Intersubunit bridges of the bacterial ribosome // *J. Mol. Biol.* — 2016. — Vol. 428, 10 PtB. — P. 2146–2164.
91. *McClory S., Leisring J., Qin D., Fredrick K.* Missense suppressor mutations in 16S rRNA reveal the importance of helices h8 and h14 in aminoacyl-tRNA selection // *RNA*. — 2010. — Vol. 16, No. 10. — P. 1925–1934.

92. *Fagan C. E., Dunkle J. A., Maehigashi T., Dang M. N., Devaraj A., Miles S. J., Daoming Q., Fredrick K., Dunham C. M.* Reorganization of an intersubunit bridge induced by disparate 16S ribosomal ambiguity mutations mimics an EF-Tu-bound state // PNAS. — 2013. — Vol. 110. — P. 9716–9721.
93. *Smith M. W., Meskauskas A., Wang P., Sergiev P. V., Dinman J. D.* Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell. Biol. — 2011. — Vol. 21. — P. 8264–8275.
94. *O'Connor M., Dahlberg A. E.* The involvement of two distinct regions of 23S ribosomal RNA in tRNA selection // J. Mol. Biol. — 1995. — Vol. 254. — P. 838–847.
95. *Polacek N., Gomez M. J., Ito K., Xiong L., Nakamura Y., Mankin A.* The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination // Mol. Cell. — 2003. — Vol. 11. — P. 103–112.
96. *Youngman E. M., Brunelle J. L., Kochaniak A. B., Green R.* The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release // Cell. — 2004. — Vol. 117. — P. 589–599.
97. *Simonovic M., Steitz T. A.* Cross-crystal averaging reveals that the structure of the peptidyl-transferase center is the same in the 70S ribosome and the 50S subunit // PNAS. — 2008. — Vol. 105. — P. 500–505.
98. *Long K. S., Vester B.* Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome // Antimicrob. Agents Chemother. — 2012. — Vol. 56. — P. 603–612.
99. *Simonović M., Steitz T.* Peptidyl-CCA deacylation on the ribosome promoted by induced fit and the O3'-hydroxyl group of A76 of the unacylated A-site tRNA // RNA. — 2008. — Vol. 14, No. 11. — P. 2372–2378.
100. *Schmeing T. M., Huang K. S., Strobel S. A., Steitz T. A.* An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA // Nature. — 2005. — Vol. 438. — P. 520–524.

101. *Lehmann J.* Induced fit of the peptidyl-transferase center of the ribosome and conformational freedom of the esterified amino acids // *RNA*. — 2017. — Vol. 23, No. 2. — P. 229–239.
102. *Bayfield M. A., Dahlberg A. E., Schulmeister U., Dorner S., Barta A.* A conformational change in the ribosomal peptidyl transferase center upon active/inactive transition // *PNAS*. — 2001. — Vol. 98, No. 18. — P. 10096–10101.
103. *Vázquez-Laslop N., Ramu H., Mankin A.* Nascent peptide-mediated ribosome stalling promoted by antibiotics // *Ribosomes: Structure, Function, and Dynamics*. — 2011. — Vol. Section V. — P. 377–392.
104. *Vázquez-Laslop N., Ramu H., Klepacki D., Kannan K., Mankin A. S.* The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide // *EMBO J*. — 2010. — Vol. 29, No. 18. — P. 3108–3117.
105. *Cruz-Vera L. R., Rajagopal S., Squires C., Yanofsky C.* Features of ribosome-peptidyl-trna interactions essential for tryptophan induction of tna operon expression // *Mol. Cell*. — 2005. — Vol. 19, No. 3. — P. 333–343.
106. *Yang R., Cruz-Vera L. R., Yanofsky C.* 23S rRNA nucleotides in the peptidyl transferase center are essential for tryptophanase operon induction // *J. Bacteriol*. — 2009. — Vol. 191, No. 11. — P. 3445–3450.
107. *Vázquez-Laslop N., Thum C., Mankin A.* Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling // *Mol. Cell*. — 2008. — Vol. 30. — P. 190–202.
108. *Lawrence M. G., Lindahl L., Zengel J. M.* Effects on translation pausing of alterations in protein and RNA components of the ribosome exit tunnel // *J. Bacteriol*. — 2008. — Vol. 190, No. 17. — P. 5862–5869.
109. *Nakatogawa H., Ito K.* The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate // *Cell*. — 2002. — Vol. 108, No. 5. — P. 629–636.
110. *Cruz-Vera L. R., Gong M., Yanofsky C.* Changes produced by bound tryptophan in the ribosome peptidyl transferase center in response to TnaC, a nascent leader peptide // *PNAS*. — 2006. — Vol. 103, No. 10. — P. 3598–3603.

111. *Bornemann T., Jöckel J., Rodnina M. V., Wintermeyer W.* Signal sequence-independent membrane targeting of ribosomes containing short nascent peptides within the exit tunnel // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 15, No. 5. — P. 494–499.
112. *Ramu H., Vázquez-Laslop N., Klepacki D., Dai Q., Piccirilli J., Micura R., Mankin A. S.* Nascent peptide in the ribosome exit tunnel affects functional properties of the A-site of the peptidyl transferase center // *Mol. Cell.* — 2011. — Vol. 41. — P. 321–330.
113. *Arenz S., Meydan S., Starosta A., Berninghausen O., Beckmann R., Vázquez-Laslop N., Wilson D.* Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation // *Mol. Cell.* — 2014. — Vol. 56. — P. 446–452.
114. *Vázquez-Laslop N., Klepacki D., Mulhearn D. C., Ramu H., Krasnykh O., Franzblau S., Mankin A. S.* Role of antibiotic ligand in nascent peptide-dependent ribosome stalling // *PNAS.* — 2011. — Vol. 108, No. 26. — P. 10496–10501.
115. *Sothiselvam S., Liu B., Han W., Ramu H., Klepacki D., Atkinson G. C., A. B., Remm M., Tenson T., Schulten K., Vazquez-Laslop N., Mankin A. S.* Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest // *PNAS.* — 2014. — Vol. 111. — P. 9804–9809.
116. *Seidelt B., Innis C. A., Wilson D. N., Gartmann M., Armache J.-P., Villa E., Leonardo G. T., Becker T., Mielke T., Schulten K., Steitz T. A., Beckmann R.* Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling // *Science.* — 2009. — Vol. 326. — P. 1412–1415.
117. *Makarov G. I., Golovin A. V., Sumbatyan N. V., Bogdanov A. A.* Molecular dynamics investigation of a mechanism of allosteric signal transmission in ribosomes // *Biochemistry (Moscow).* — 2015. — Vol. 80. — P. 1047–1056.
118. *Rhodin M. H. J., Dinman J. D.* An extensive network of information flow through the B1b/c intersubunit bridge of the yeast ribosome // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6. — e20048.
119. *Khaitovich P., Mankin A. S.* Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5S rRNA // *J. Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 291. — P. 1025–1034.

120. *Fischer N., Konevega A. L., Wintermeyer W., Rodnina M. V., Stark H.* Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy // *Nature*. — 2010. — Vol. 466. — P. 329–333.
121. *Frank J., Agrawal R. K.* A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation // *Nature*. — 2000. — Vol. 406. — P. 318–322.
122. *Blanchard S. C., Kim H. D., Gonzalez R. L., Puglisi J. D., Chu S.* tRNA dynamics on the ribosome during translation // *PNAS*. — 2004. — Vol. 101. — P. 12893–12898.
123. *Fei J., Kosuri P., MacDougall D. D., Gonzalez R. L.* Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation // *Mol. Cell*. — 2008. — Vol. 30. — P. 348–359.
124. *Cornish P. V., Ermolenko D. N., Noller H. F., Ha T.* Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes // *Mol. Cell*. — 2008. — Vol. 30. — P. 578–588.
125. *Cornish P. V., Ermolenko D. N., Staple D. W., Hoang L., Hickerson R. P., Noller H. F., Ha T.* Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes // *PNAS*. — 2009. — Vol. 106. — P. 2571–2576.
126. *Liu Q., Fredrick K.* Contribution of intersubunit bridges to the energy barrier of ribosomal translocation // *Nucleic Acids Res.* — 2013. — Vol. 41. — P. 565–574.
127. *Fei J., Bronson J. E., Hofman J. M., Srinivas R. L., Wiggins C. H., Gonzalez R. L.* Allosteric collaboration between elongation factor G and the ribosomal L1 stalk directs tRNA movements during translation // *PNAS*. — 2009. — Vol. 106. — P. 15702–15707.
128. *Shoji S., Walker S. E., Fredrick K.* Ribosomal translocation: one step closer to the molecular mechanism // *ACS Chem. Biol.* — 2009. — Vol. 4. — P. 93–107.
129. *Tsai A., Uemura S., Johansson M., Puglisi E. V., Marshall R. A., Aitken C. E., Korlach J., Ehrenberg M., Puglisi J. D.* The impact of aminoglycosides on the dynamics of translation elongation // *Cell Rep.* — 2013. — Vol. 3. — P. 497–508.
130. *Wang L., Pulk A., Wasserman M. R., Feldman M. B., Altman R. B., Cate J. H. D., Blanchard S. C.* Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2012. — Vol. 19. — P. 957–963.

131. *Ning W., Fei J., Gonzalez R. L.* The ribosome uses cooperative conformational changes to maximize and regulate the efficiency of translation // PNAS. — 2014. — Vol. 111. — P. 12073–12078.
132. *Shoji S., Walker S. E., Fredrick K.* Reverse translocation of tRNA in the ribosome // Mol. Cell. — 2006. — Vol. 24. — P. 931–942.
133. *Fredrick K., Noller H. F.* Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin // Science. — 2003. — Vol. 300. — P. 1159–1162.
134. *Ermolenko D. N., Cornish P. V., Ha T., Noller H. F.* Antibiotics that bind to the A site of the large ribosomal subunit can induce mRNA translocation // RNA. — 2013. — Vol. 19. — P. 158–166.
135. *Zavialov A. V., Ehrenberg M.* Peptidyl-tRNA regulates the GTPase activity of translation factors // Cell. — 2003. — Vol. 114. — P. 113–122.
136. *Chen C., Stevens B., Kaur J., Cabral D., Liu H., Wang Y., Zhang H., Rosenblum G., Smilansky Z., Goldman Y. E., Cooperman B. S.* Single molecule fluorescence measurements of ribosomal translocation dynamics // Mol. Cell. — 2011. — Vol. 42. — P. 367–377.
137. *Sergiev P. V., Lesnyak D. V., Kiparisov S. V., Burakovsky D. E., Leonov A. A., Bogdanov A. A., Brimacombe R., Dontsova O. A.* Function of the ribosomal E-site: a mutagenesis study // Nucleic Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — P. 6048–6056.
138. *Sergiev P. V., Kiparisov S. V., Burakovsky D. E., Lesnyak D. V., Leonov A. A., Bogdanov A. A., Dontsova O. A.* The conserved A-site finger of the 23S rRNA: just one of the intersubunit bridges or a part of the allosteric communication pathway // J. Mol. Biol. — 2005. — Vol. 353. — P. 116–123.
139. *Sergiev P. V., Lesnyak D. V., Burakovsky D. E., Kiparisov S. V., Leonov A. A., Bogdanov A. A., Brimacombe R., Dontsova O. A.* Alteration in location of a conserved GTPase-associated center of the ribosome induced by mutagenesis influences the structure of peptidyltransferase center and activity of elongation factor G // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280. — P. 31882–31889.
140. *Sergiev P. V., Bogdanov A. A., Dahlberg A. E., Dontsova O. A.* Mutations at position A960 of E. coli 23S ribosomal RNA influence the structure of 5S ribosomal RNA and the peptidyltransferase region of 23S ribosomal RNA // J. Mol. Biol. — 2000. — Vol. 299. — P. 379–389.

141. *Lancaster L., Lambert N. J., Maklan E. J., Horan L. H., Noller H. F.* The sarcin-ricin loop of 23S rRNA is essential for assembly of the functional core of the 50S ribosomal subunit // *RNA*. — 2008. — Vol. 14. — P. 1999–2012.
142. *Petrov A., Meskauskas A., Dinman J. D.* Ribosomal protein L3: influence on ribosome structure and function // *RNA Biol*. — 2004. — Vol. 1. — P. 59–65.
143. *Belousoff M. J., Eyal Z., Radjainia M., Ahmed T., Bamert R. S., Matzov D., Bashan A., Zimmerman E., Mishra S., Cameron D., Elmlund H., Peleg A. Y., Bhushan S., Lithgow T., Yonath A.* Structural basis for linezolid binding site rearrangement in the *Staphylococcus aureus* ribosome // *mBio*. — 2017. — Vol. 8. — e00395–17.
144. *Blaha G., Gurel G., Schroeder S. J., Moore P. B., Steitz T. A.* Mutations outside the anisomycin binding site can make ribosomes drug-resistant // *J. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 379. — P. 505–519.
145. *Stagno J. R.* [et al.]. Structures of riboswitch RNA reaction states by mix-and-inject XFEL serial crystallography // *Nature*. — 2017. — Vol. 541. — P. 242–246.
146. *Bowerman S., Wereszczynski J.* Detecting allosteric networks using molecular dynamics simulation // *Methods Enzymol*. — 2016. — Vol. 578. — P. 429–447.
147. *Hertig S., Latorraca N. R., Dror R. O.* Revealing atomic-level mechanisms of protein allostery with molecular dynamics simulations // *PLoS Comput. Biol.* — 2016. — Vol. 12, No. 6. — e1004746.
148. *Makarov G. I., Makarova T. M., Sumbatyan N. V., Bogdanov A. A.* Investigation of ribosomes using molecular dynamics simulation methods // *Biochemistry (Moscow)*. — 2016. — Vol. 81. — P. 1579–1588.
149. *Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* — 1983. — Vol. 79. — P. 926–935.
150. *Garza-Ramos G., Xiong L., Zhong P., Mankin A.* Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA // *J. Bacteriol.* — 2001. — Vol. 183. — P. 6898–6907.
151. *Porse B. T., Garrett R. A.* Mapping important nucleotides in the peptidyl transferase centre of 23S rRNA using a random mutagenesis approach // *J. Mol. Biol.* — 1995. — Vol. 249, No. 8. — P. 1–10.

152. *Spahn C. M. T., Remme J., Schäfer M. A., Nierhaus K. H.* Mutational analysis of two highly conserved UGG sequences of 23 S rRNA from *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271, No. 51. — P. 32849–32856.
153. *Gulay S. P., Bista S., Varshney A., Kirmizialtin S., Sanbonmatsu K. Y., Dinman J. D.* Tracking fluctuation hotspots on the yeast ribosome through the elongation cycle // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — Vol. 45, No. 8. — P. 4958–4971.
154. *Schlünzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F.* Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria // *Nature.* — 2001. — Vol. 413. — P. 814–821.
155. *Sugiyama H., Yoshida I., Ueki M., Tanabe K., Manaka A., Hiramatsu K.* In vitro antibacterial activity of α -methoxyimino acylide derivatives against macrolide-resistant pathogens and mutation analysis in 23S rRNA // *J. Antibiot.* — 2017. — Vol. 70, No. 3. — P. 264–271.
156. *Makarov G., Makarova T.* A noncanonical binding site of chloramphenicol revealed via molecular dynamics simulations // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subjects.* — 2018. — Vol. 1862, No. 12. — P. 2940–2947.
157. *Jack A. Dunkle J., Xiong L., Mankin A., Cate J.* Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action // *PNAS.* — 2010. — Vol. 107, No. 40. — P. 17152–17157.
158. *Cannone J. J., Subramanian S., Schnare M. N., Collett J. R., D'Souza L. M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabusi L. V., Müller K. M., Pande N., Shang Z., Yu N., Gutell R. R.* The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs // *BMC Bioinformatics.* — 2002. — Vol. 3, No. 1. — P. 1–31.
159. *Byrd R., Lu P., Nocedal J.* A limited memory algorithm for bound constrained optimization. // *SIAM J. Scientific. Statistic. Comput.* — 1995. — Vol. 16. — P. 1190–1208.
160. *Athavale S., Petrov A., Hsiao C., Watkins D., Prickett C., Gossett J., Lie L., Bowman J., O'Neill E., Hud C. B. N., Wartell R., Harvey S., Williams L.* RNA folding and catalysis mediated by iron (II) // *PLOS One.* — 2012. — Vol. 7. — P. 1–7.

161. *Spoel D. van der, Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A., Berendsen H.* GROMACS: fast, flexible, free // *J. Comput. Chem.* — 2005. — Vol. 26. — P. 1701–1718.
162. *Spoel D. van der, Lindahl E., Hess B., Kutzner C.* GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // *J. Chem. Theory Comput.* — 2008. — Vol. 4. — P. 435–447.
163. *Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A.* Development and testing of a general amber force field // *J. Comput. Chem.* — 2004. — Vol. 25. — P. 1157–1174.
164. *Schmidt M. W., Baldridge K. K., Boatz J. A., Elbert S. T., Gordon M. S., Jensen J. H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K. A., Su S., Windus T. L., Dupuis M., Montgomery J. A.* General atomic and molecular electronic structure system // *J. Comput. Chem.* — 1993. — Vol. 14, No. 11. — P. 1347–1363.
165. <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>.
166. *Laikov D. N., Ustynyuk Y. A.* PRIRODA-04: a quantum-chemical program suite. new possibilities in the study of molecular systems with the application of parallel computing // *Russ. Chem. Bull.* — 2005. — Vol. 54. — P. 820–826.
167. *Laikov D. N.* A new parametrizable model of molecular electronic structure // *J. Chem. Phys.* — 2011. — Vol. 135.
168. *Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W., Kollman P. A.* A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model // *J. Phys. Chem.* — 1993. — Vol. 97, No. 40. — P. 10269–10280.
169. *Bussi G., Donadio D., Parrinello M.* Canonical sampling through velocity rescaling // *J. Chem. Phys.* — 2007. — Vol. 126. — P. 014107–014106.
170. *Berendsen H., Postma J., Gunsteren W. van, DiNola A., Haak J.* Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* — 1984. — Vol. 81. — P. 3684–3690.
171. *Darden T., York D., Pedersen L.* Particle mesh Ewald: an $N\log(N)$ method for Ewald sums in large systems // *J. Chem. Phys.* — 1993. — Vol. 98. — P. 10089–10092.

172. Hess B., Bekker H., Berendsen H. J. C., Fraaije J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations // J. Comput. Chem. — 1997. — Vol. 18, No. 12. — P. 1463–1472.
173. www.arb-silva.de.