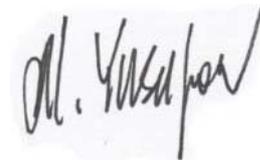


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



ЮСУПОВ Марат Миратович

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ РИБОСОМЫ ЭУКАРИОТ
Результаты рентгено-структурного анализа

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология
02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва - 2021 г.

Работа выполнена в Институте Генетики, Молекулярной и Клеточной Биологии (IGBMC),
Страсбург, Франция

Официальные оппоненты :

Шатский Иван Николаевич – доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории регуляции синтеза белка, отдела химии и биохимии нуклеопротеидов, Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова.

Арсеньев Александр Сергеевич – доктор химических наук, профессор, заведующий отделом структурной биологии, заведующий лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии РАН имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Карпова Галина Георгиевна - доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией структуры и функции рибосом, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН.

Защита диссертации состоится 12 октября 2021 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, Лабораторный корпус «А», аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/374180401/>

Автореферат разослан «___» июня 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук, доцент



Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Экспрессия генов в клетках живых организмов - это перевод генетической информации, записанной четырех-буквенным кодом нуклеотидов в молекуле ДНК (хромосома), в структуру белка, состоящего из двадцати аминокислот, и который осуществляется макромолекулярной машиной рибосомой. Энзиматические реакции рибосомы исследовались несколько десятилетий и к моменту начала нашего структурного исследования уже было составлено схематическое представление о практически всех процессах работы рибосомы и участия основных лигандов белкового синтеза. Были описаны свойства матричных РНК (мРНК), транспортных РНК (тРНК) и белковых факторов трансляции, обеспечивающих синтез белка в клетке. На начальных этапах, исследования структуры рибосомы были сфокусированы на отдельных компонентах составляющих бактериальную рибосому из клеток *Escherichia coli*, представляющих наиболее удобную модель для лабораторных исследований. В результате было показано, что бактериальная рибосома состоит из двух неравных несимметричных субчастиц. Большая субчастица 50S содержит две цепи рибосомной РНК (рРНК) (23S рРНК, 2904 нуклеотида, и 5S рРНК, 120 нуклеотидов) и 32 индивидуальных рибосомных белка. Малая субчастица 30S содержит одну рибосомную РНК (16S рРНК, 1542 нуклеотида) и 21 индивидуальных рибосомных белка. Нуклеотидные последовательности рибосомных РНК были определены и вторичные структуры были предсказаны. Первичные структуры рибосомных белков были также определены. Методом рентгено-структурного анализа были исследованы структуры ряда индивидуальных рибосомных белков. На основании результатов электронной микроскопии впервые было предложено описание формы рибосомы. Было также показано, что рибосомная РНК формирует основу структуры обеих субчастиц и определяет ее форму. Оказалось, что часть рибосомных белков, названных «основными», помогают формировать основу, так называемую «сердцевину» рибосомы, а другая часть рибосомных белков, названных «вспомогательными», расположены ближе к поверхности рибосомы. С помощью метода бомбардировки газообразным тритием было обнаружено полное отсутствие рибосомальных белков на поверхности контакта двух рибосомных субчастиц. Этим же методом было показано, что на поверхности рибосомы индивидуальные рибосомные белки экспонированы в разной степени.

Первые кристаллы 50S рибосомных субчастиц пригодных для использования рентгено-структурного анализа были получены в группе Ады Йонат в Западном Берлине в 1982. Первые кристаллы 30S рибосомных субчастиц и полной 70S рибосомы были получены нами в совместном проекте Института белка АН СССР и Института Кристаллографии АН СССР в 1983. Эта методология кристаллизации рибосом и рибосомных субчастиц была позже оптимизирована и использована для решения структуры этих макромолекул методом рентгено-структурного анализа.

Первая кристаллическая структура полной 70S рибосомы *Thermus thermophilus* была решена нами в совместном проекте с Гарри Ноллером (Калифорнийский Университет, США) при среднем разрешении в 2000 году. Кристаллические структуры рибосомных субчастиц были решены с использованием 30S субчастиц *T. thermophilus* и 50S субчастиц *Haloarcula marismortui*. Полученные модели индивидуальных рибосомных субчастиц и экспериментальные карты электронной плотности полной 70S рибосомы содержащие три молекулы тРНК и мРНК были использованы нашей группой для моделирования полной рибосомы *T. Thermophilus*.

Степень разработанности темы

Ранее были обнаружены двумерные кристаллы эукариотических рибосом в клетках эмбриона курицы. Были разработаны подходы для кристаллизации рибосомных частиц термофильных бактерий. Была решена кристаллическая структура бактериальной рибосомы. Знания о структуре эукариотической рибосомы в основном базировались на знаниях структуры бактериальной рибосомы.

Цели и задачи исследования

Кристаллизация и определение атомарной структуры рибосомы эукариот являются логическим продолжением исследования бактериальной рибосомы. С одной стороны знания структуры рибосомы эукариот открывают возможность исследования сложных механизмов регуляции трансляции высших организмов, а с другой стороны сравнение структуры с рибосомой прокариот позволяет объяснить правила распознавания антибиотиками рибосом бактерий и человека.

Были поставлены следующие задачи:

1. Определить кристаллическую структуру полной рибосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Сравнить структуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* с рибосомами бактерий и человека.
3. Определить структуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* в комплексе с ингибиторами трансляции эукариот.
4. Определить структуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* в комплексе с ингибиторами - потенциальными лекарствами против раковых заболеваний.
5. Определить структуру рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* в комплексе с ингибиторами - потенциальными лекарствами против генетических заболеваний, вызванных появлением преждевременных «стоп» кодонов в смысловых генах.

Объект исследования – кристаллография эукариотической рибосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Предмет исследования – структура рибосомы эукариот

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые определена кристаллическая структура рибосомы низших эукариот дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Впервые проведены сравнения структур рибосом бактерий и низших эукариот. Показана высокая гомология и консервативность основных функциональных центров рибосом в участках связывания мРНК и тРНК у бактерий, низших и высших эукариот, включая человека. Выявлены правила дескриминации рибосом прокариот и эукариот для ряда ингибиторов трансляции.

Показана возможность использования кристаллографии *Saccharomyces cerevisiae* рибосом в разработке лекарственных препаратов для человека.

Методология диссертационного исследования

При разработке методов выделения, очистки и кристаллизации рибосом *Saccharomyces cerevisiae* использовали современные биохимические и биофизические методы для анализа структурного качества препаратов. Решение структуры рибосом *Saccharomyces cerevisiae* и ее комплексов было выполнено методом рентгено-структурного анализа с применением современных синхротронов в Швейцарии и Франции, оптимизированных для работы с макромолекулярными комплексами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Кристаллическая структура эукариотической рибосомы *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Консервативность функциональных центров рибосомы прокариот и эукариот.
3. Структура центров связывания 16 эукариот-специфических ингибиторов рибосомы.
4. Правила специфичности для ингибиторов декодирующего центра и пептидил-трансферазного центра эукариотической рибосомы.
5. Центры связывания и механизмы функционирования на рибосоме 4 новых веществ, потенциальных антираковых препаратов.
6. Центры связывания на рибосоме 4 аминокликозидов, потенциальных лекарств при генетических заболеваниях, связанных с появлением преждевременных «стоп» мутаций в смысловых последовательностях генов.

Степень достоверности результатов

Основной метод в представленной серии работ – метод рентгено-структурного анализа, который дает наиболее достоверную информацию о структуре макромолекул,

полученных в кристаллической форме. Полученные электронные плотности с разрешением 3.5 – 2.8 Å интерпретированы на атомарном уровне достоверности.

Апробация работы

Результаты работы были представлены в виде устных докладов на 76 международных конференциях, включая основные доклады конференций: Структура и функция рибосомы, Франция, 2016 (The EMBO Keynote Lecture), Конференция кристаллографического общества Австрии, 2014 (The EMBO Keynote Lecture), Структура и функция tRNA, Греция, 2014 (The EMBO Keynote Lecture), Европейский кристаллографический конгресс, Англия 2013, (The EMBO Keynote Lecture), Биогенез рибосомы, Канада, 2012 (The EMBO Keynote Lecture).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 46 публикациях, представленных в международных системах цитирования Web of Science и Scopus, а также в библиографической базе PubMed.

Личный вклад автора

Диссертационная работа выполнена автором лично. Исследования затрагивали многие аспекты молекулярной биологии и выполнены в соавторстве с большим коллективом. Первая часть работы по кристаллизации рибосомы бактерий и предварительный рентгено-структурный анализ был выполнен в Институте белка АН СССР в сотрудничестве с Институтом кристаллографии АН СССР и Институтом Молекулярной и клеточной биологии в Страсбурге, Франция. Вторая часть работы по решению структуры бактериальной рибосомы была выполнена в Калифорнийском университете, США. Третья часть работы по решению структуры рибосомы дрожжей была выполнена в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии в Страсбурге, Франция. Автору принадлежит основная роль в выборе направления исследований, формулировке целей и задач исследований, проведении экспериментов, разработке методик, анализу полученных результатов, обобщении и представлении результатов в виде статей и докладов на конференциях.

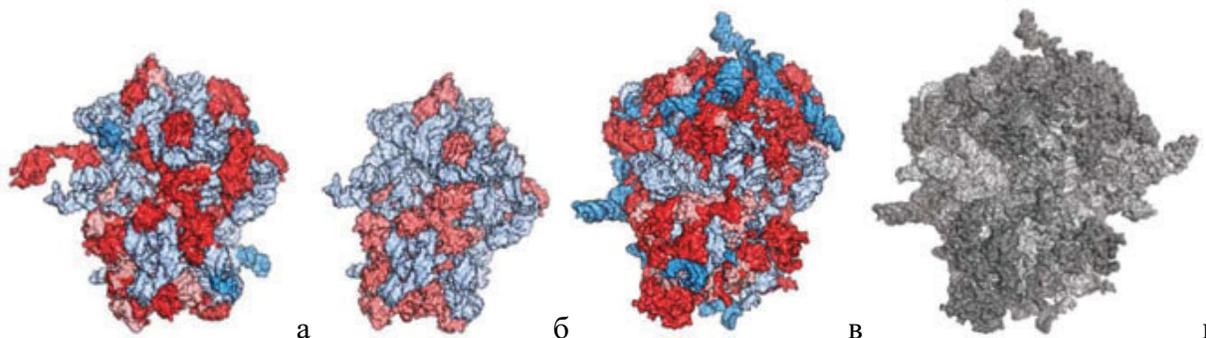
Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы» (раздел содержит 195 ссылки). Работу иллюстрируют 56 рисунков и 2 таблицы. Общий объем диссертации 151 страница.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Модель рибосомы эукариот. Консервативное ядро рибосомы.

Как бактериальные 70S (Рис. 1а), так и дрожжевые 80S (Рис. 1в), рибосомы являются асимметричными макромолекулярными комплексами, содержащими более 50 (для бактерий) и 80 (для дрожжей) различных белков и три или четыре рРНК. Каждый рибосомный компонент представлен в рибосоме одной копией, за исключением белков стебля L7/L12 или P1/P2, которые присутствуют в четырех или шести экземплярах. Ранние генетические данные, подтвержденные структурными исследованиями, предполагали что бактериальные и эукариотические рибосомы имеют общее структурное «ядро» (Рис. 1б), которое состоит из 34 консервированных белков (15 в малой субчастице и 19 в большой субчастице) и ~4400 рНК-оснований, которые содержат основные функциональные центры рибосомы, такие как декодирующий участок, пептидилтрансферазный центр, а также тРНК и м РНК связывающие участки.



ПРОКАРИОТЫ	КОНСЕРВАТИВНОЕ ЯДРО РИБОСОМЫ	ДРОЖЖИ	ЧЕЛОВЕК
2.3 MDa	2.0 MDa	3.3 MDa	4.3 MDa
54 белка	34 белка	79 белков	80 белков
3 рРНК молекулы	3 рРНК молекулы	4 рРНК молекулы	4 рРНК молекулы
Большая субчастица: 50S	Большая субчастица:	Большая субчастица: 60S	Большая субчастица: 60S
33 белка (+14)	19 белков	46 белков (+26)	47 белков (++)
23S рРНК:	23S рРНК:	25S рРНК:	28S рРНК:
2,904 оснований	2,843 оснований	3,396 оснований	5,034 оснований

5S рРНК: 121 оснований	5S рРНК: 121 оснований	5S рРНК: 121 оснований	5S рРНК: 121 оснований
		5.8SpРНК:158 оснований	5.8SpРНК:156 оснований
Малая субчастица: 30S	Малая субчастица	Малая субчастица: 40S	Малая субчастица: 40S
21 белок (+6)	15 белков	33 белка(+18)	33 белка(+19)
16SpРНК:1,542 оснований	16S: 1,458 оснований	18SpРНК: 1,800 оснований	18SpРНК: 1,870 оснований

Рис. 1. Состав бактериальных (а) и эукариотических рибосом (в) и общее «ядро» (б). Бактериальные и эукариотические рибосомы разделяют массивное консервативное ядро, состоящее из РНК (светло-голубой) и белков (светло-красный). Рибосомы прокариот и эукариот содержат свой дополнительный к ядру набор белков. Дополнительные белки выделены на рисунке (ярко красный цвет) и дополнительные последовательности в рибосомальной РНК (синий цвет). Как 5.8 S, так и 25–28S молекулы рРНК являются гомологичными 23S рРНК у бактерий. Структура рибосомы высших эукариот, таких как рибосома человека, не была определена методом рентгено-структурного анализа, аналогично решенным структурам дрожжей и рибосом бактерий. Структура рибосомы человека представлена сером цвете (г), а пунктирные линии указывают на положение дополнительных последовательностей рРНК, которые обычно неупорядочены и не видимы в рентгеновских структурах и в ЭМ структурах. Структура рибосомы человека была определена методом крио-электронной микроскопии без дополнительных последовательностей рРНК, остальные структуры определены методом рентгено-структурного анализа.

Дополнительно к основному «ядру» (Рис. 1б), 70S рибосома содержит 20 бактерия-специфических белков (6 в 30S субчастице и 14 в 50S субчастице); несколько удлинений в консервативных белках, таких как белки S2, S3 и S4; и несколько удлинений рРНК, таких как спирали h6, h17 и h33a в 16S рРНК и спирали H1 и H68 в 23S рРНК.

80S рибосома содержит 46 эукариот-специфических белков (18 в 40S субчастице и 28 в 60S субчастице). Если сравнивать бактериальную рибосому и рибосому дрожжей, то количество белков увеличивается с 54 до 79, а длина рРНК увеличивается почти на 1000 нуклеотидов. Если сравнивать рибосому дрожжей и рибосому высших эукариот и человека, то количество белков увеличивается на один белок с 79 до 80, а длина рРНК увеличивается

еще почти на 2000 нуклеотидов. Таким образом, молекулярный вес рибосомы высших эукариот и бактерий различается почти в два раза 2.3 МДа и 4.3 МДа.

Дополнительные сегменты рибосомных РНК. Состав рибосом также может варьировать внутри бактерий, внутри эукариот, и внутри одного вида в разных условиях роста и стресса. У эукариот, размер рибосомы колеблется в пределах ~1 МДа, главным образом из-за вставок в четырех удлинненных сегментов ES7L, ES15L, ES27L и ES39L в 25S-28S рРНК и сегментов ES3S и ES6S в 18S рРНК. В нескольких случаях, рибосомы содержат на один белок меньше или на один белок больше.

Дополнительные рибосомные белки. Модель дрожжевой рибосомы включает в себя 79 индивидуальных рибосомных белков. Из них 46 белков 60S субчастицы и 33 белка 40S субчастицы. Многие рибосомные белки имеют необычные складки и содержат удивительно длинные хвосты и петли, идущие от глобулярных доменов. Большинство из них не погружены в глубь РНК ядра рибосомы, как в случае бактериальной рибосомы, а расположены на поверхности, где они в основном связаны с другими специфичными фрагментами для эукариот. Считается, что на ранних стадиях биогенеза рибосом рибосомные белки используют глобулярные домены для распознавания специфических областей рРНК, тогда как их белковые хвосты и петли способствуют сворачиванию рРНК путем нейтрализации отрицательного заряда фосфатов РНК. С определением кристаллической структуры эукариотической рибосомы стало ясно, что эти необычные белковые складки еще более распространены у эукариот (например, расширения белков uL4, uL22, uL23, uL29 и uS3 эукариот в сравнении с их бактериальными эквивалентами). Большинство из этих вставок и расширений взаимодействуют с другими специфичными для эукариот белками и сегментами расширения рРНК (например, uL4 с ES7L и ES15L и uL22 с ES39L), предполагая, что расширения белков могут способствовать сборке специфичных для эукариот компонентов рибосом во время биогенеза.

Анализ структуры рибосомы эукариот. Рибосомные 30S и 40S субчастицы имеют схожие очертания, в том числе и ориентиры, известные как «голова», «тело», «платформа», (Рис. 2). Функциональные участки: мРНК и тРНК связывающие участки (А, Р и Е) расположены на внутренней поверхности субчастицы. мРНК поступает через туннель, расположенный между головой и плечом (между белками uS3, uS5) и проходит вокруг шеи внутренней поверхности субчастицы. Место выхода мРНК (5'-конец мРНК) находится между головкой и платформой (между белками uS7, uS11). Декодированный центр h 44 находится на внутренней поверхности малой субчастицы рядом с белком uS12 и белком eS30 (Рис. 2).

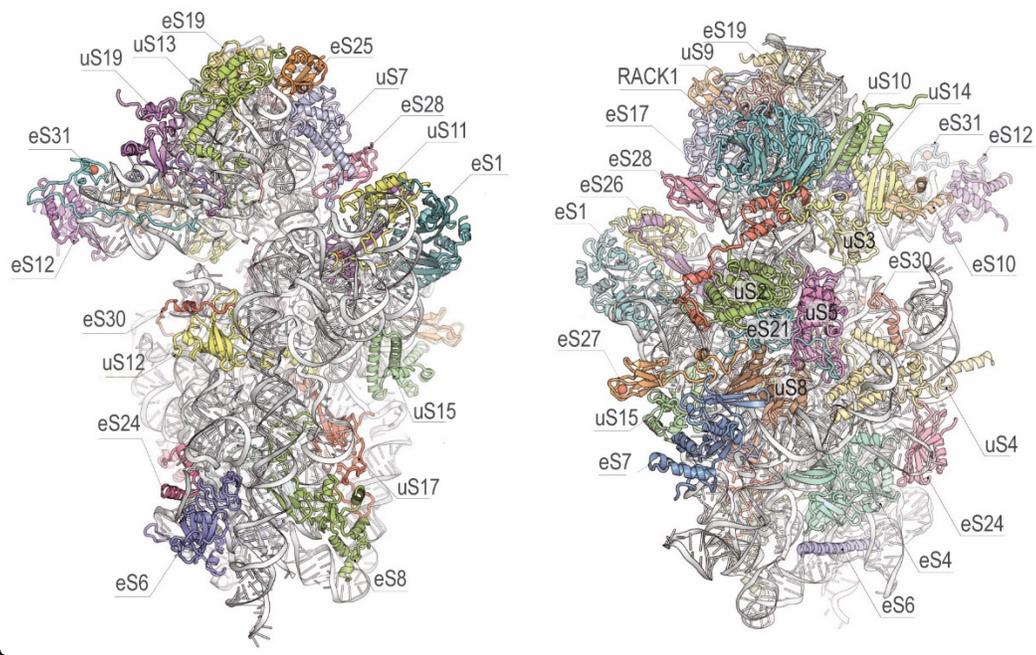


Рис. 2. Структура 40S субчастицы. (А) внутренняя поверхность субчастицы. (Б) поверхность субчастицы, обращенная к раствору.

Рибосомные 50S и 60S субъединицы имеют аналогичные корноподобные формы, которые имеют «центральную выпуклость», стебель L1 и L7/L12 стебель (у прокариот) или стебель P (у эукариот) (Рис. 3). Большая рибосомная субчастица имеет 27 белков специфичных для эукариот и множество вставок и удлинений консервативных белков, и несколько удлинений рРНК, образуя почти непрерывный кольцеобразный узел, который огибает ядро.

На внутренней стороне большой субчастицы находятся три тРНК связывающих участка (А, Р и Е) и пептидилтрансферазный центр, где происходит образование пептидной связи. Этот пептидилтрансферазный центр находится рядом со входом в тоннель, по которому зарождающиеся белки продвигаются через тело субчастицы на выход на сторону обращенную к раствору.

Консервативность функциональных участков. Отсутствие специфичных доменов рРНК и белков для бактерий или для эукариот в центральной части внутренней поверхности обеих субчастиц согласуется с универсальной консервативностью рибосомных функциональных участков, которые находятся в этой области рибосомы. Структура декодирующего участка, пептидилтрансферазного центра, область вокруг пептидного туннеля на стороне раствора, которая используется для ассоциации рибосом с мембранами во время синтеза белка, также лишена специфических фрагментов (Рис. 4).

очевидна, потому что они поддерживают взаимосвязь между малой и большой субчастицами при работе рибосомы. Во время синтеза белка рибосома претерпевает глобальные конформационные перестройки, которые необходимы для транслокации мРНК и тРНК. Эти изменения связаны с межсубчастичным вращением и поворотом головного домена малой субчастицы.

Несколько специфичных для эукариот межсубчастичных мостов были описаны по результатам анализа низкого разрешения крио-ЭМ исследований рибосомы дрожжей. Наша модель дала более точный и детальный обзор молекулярных компонентов, участвующих в этих контактах между субчастицами рибосом. В рибосомном ядре имеется семь мостов между субчастицами. Дополнительно к ним есть несколько бактериальных - и эукариотспецифических мостов. В отличие от бактерий, в формировании эукариотспецифичных мостов белки играют доминирующую роль. Специфичные для эукариот мосты расположены на периферии границы раздела субъединиц и со стороны растворителя обеих субъединиц (Рис.5).

Существует только один специфичный для эукариот мост, расположенный в центре рибосомы мостик eB14. Мост образуется самым маленьким белком в дрожжевых клетках (25 аминокислот) белок eL41, который состоит из одной альфа-спирали. eL41 выступает из большой в малую субчастицу около декодирующего участка.

У бактерий есть только один пример такого необычного моста, то есть образованного рибосомным белком большой субчастицы и связанного с малой субчастицей. Этот необычный мостик образован белком bL31, который соединяет центральную выпуклость большой субчастицы с лабильным головным доменом малой субчастицы.

Отличительной особенностью эукариотической большой субчастицы является наличие двух длинных белковых спиралей, идущие слева и справа субчастицы. Эти спирали, которые являются специфичными для эукариот удлиннениями белков eL19 и eL24, создают мосты eB12 и eB13. Белок eL24 состоит из N-терминального домена, который находится на большой субчастице далее идет длинный гибкий хвост, который выступает далеко в сторону тела малой субчастицы и достигает задней части субчастицы. Эта структура eL24 является ключевым игроком в повторной инициации при считывании полицистронных мРНК.

Нерибосомный белок Stm1. Анализ структуры дрожжевой рибосомы выявил один дополнительный нерибосомный белок, который был идентифицирован, как белок Stm1. Известно, что белок Stm1 может быть ассоциирован с рибосомами и может ингибировать синтез белка, но природа и роль этих взаимодействий была неизвестна. Наша структура показала, что Stm1 связывается с головным доменом 40S субчастицы и исключает связывание мРНК (Рис. 6). Кроме того, Stm1 следует по пути мРНК через тРНК связывающие участки А и Р. Далее белок переходит в область центрального выступа 60S субчастицы, взаимодействуя со спиралью H84 и далее с 5S рРНК и белком uL5 (рис. 6).

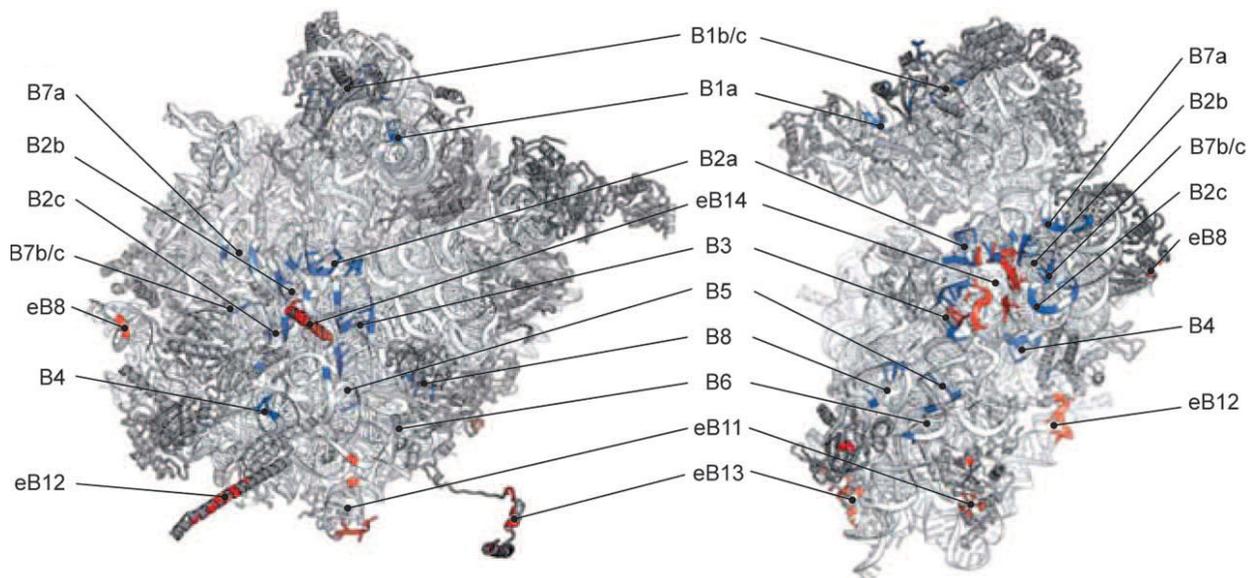


Рис. 5. Контактные внутренние поверхности субчастиц и межсубчастичные мосты специфические для эукариот обозначены, как eB. Белок eL19, участвует в формировании моста eB12. Белок eL24 простирается от большой субчастицы для взаимодействия с белком eS6 на малой субчастице, формируя мост eB13. Белок eL41 формирует мост eB14.

Вдоль всей длины белок *Stm1* контактирует с девятью различными рибосомными белками, с одним на 60S субчастице и с восьмью на 40S субчастице. Располагаясь на рибосоме таким образом белок *Stm1* сжимает две субъединицы, предотвращает их диссоциацию. Было показано, что *Stm1* играет важную роль в восстановлении дрожжей после длительных периодов дефицита питательных веществ. Поэтому мы смогли получать монорибосомы выращивая дрожжи в течение нескольких минут в условиях глюкозного голодания. Таким образом, этот белок является функциональным аналогом некоторых белков стресса прокариотических рибосом.

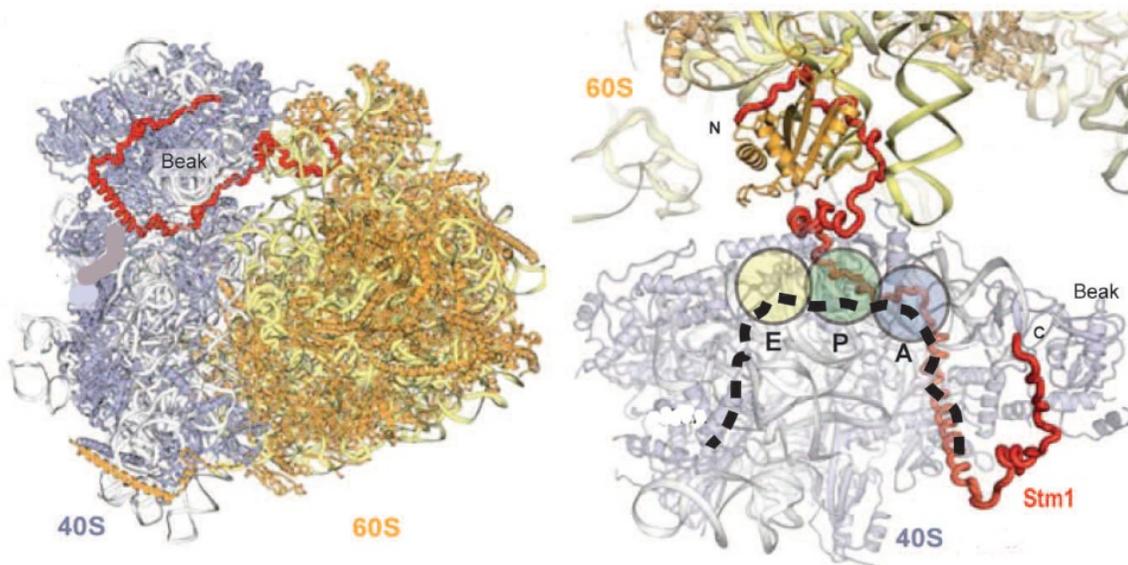


Рис. 6. Нерибосомный белок Stm1 взаимодействует с обеими субъединицами и предотвращает связывание мРНК. Рисунок слева: Белок Stm1 (красный) связывается с 40S (синий) и 60S (желтый) рибосомными субчастицами. Рисунок справа: Вид сверху на «головной» домен малой субчастицы и «центральный выступ» большой субчастицы. Пунктирная черная линия представляет собой траекторию движения мРНК по данным к кристаллическим структурам бактериальных рибосом. Окружностями указаны участки А, Р и Е тРНК.

Новая номенклатура рибосомных белков. В основе создания новой номенклатуры дрожжевых рибосомных белков лежит утверждение, что гомологичным макромолекулам, выполняющим одни и те же функции в разных организмах, должно быть присвоено одно и то же название. Гомологичные макромолекулы - это продукты генов, которые произошли от общего предка. Тот факт, что две макромолекулы гомологичны, часто можно установить просто путем сравнения их последовательностей, но иногда это становится очевидным только после того, как их трехмерные структуры были определены, так что сравнение может быть сделано с использованием первоначального выравнивания третичных, а не первичных структур белков.

Мы предложили новую систему наименования рибосомальных белков. Поскольку рибосомные белки из *E. coli* были первыми выделены и полностью секвенированы и описаны в обширной литературе, то их архейным и эукариотическим гомологам присвоены наименования белков из рибосом *E. coli*. Белкам, обнаруженным в рибосомах из всех трех главных филогенетических доменов (бактерии, архея и эукариоты) присваивается буква "u" (универсальный), который следует за их названиями *E. coli*. Бактериальные белки без эукариотических (или архея) гомологов обозначаются буквой "b" (бактериальный). Точно так же рибосомальные белки из архея, лишённые гомологов как в эубактериальных рибосомах, так и в эукариотических рибосомах, должны быть идентифицированы с помощью префикса "a" (архея), но до сих пор ни один из них не был найден. Те эукариотические рибосомные белки, которые не имеют эубактериального гомолога, получили букву "e" (эукариот).

Выводы из анализа структуры рибосом прокариот и эукариот. Опубликованные в 2000-2006 годах структуры высокого разрешения сначала бактериальных рибосомальных субъединиц и позднее полной бактериальной рибосомы, содержащей мРНК и три тРНК произвели революцию в области изучающей механизмы и функции рибосомного биосинтеза белков в клетке. Они обеспечили понимание функциональных комплексов рибосомы полученных с помощью кристаллографии и электронной микроскопии.

Решение структуры полной эукариотической рибосомы на высоком разрешении в 2011 позволило идентифицировать около 200 000 атомов (без учета водорода) структуры рибосомы.

На сегодняшний день знание атомарной структуры рибосомы, изученной в различных состояниях во время ее функционирования, облегчило интерпретацию сложных биохимических и генетических экспериментов.

Сравнение двух рибосомных структур, прокариотической рибосомы и эукариотической рибосомы, показали существование консервативной организации основных функциональных участков, ответственных за процесс элонгации трансляции. В тоже время увеличение размера эукариотической рибосомы за счет дополнительных рибосомных белков и удлинения рибосомной РНК может объяснить значительно более сложные процессы инициации трансляции, терминации и рециркуляции. По всей видимости дополнительные элементы рибосомы вовлечены в механизмы регуляции синтеза белка.

Оставался необъясненным вопрос, как малые молекулы – ингибиторы (антибиотики), которые связываются с консервативными участками рибосом, могут дискриминировать прокариотическую рибосому от эукариотической рибосомы.

Структурные исследования ингибиторов рибосомы эукариот. Открытие и глобальное использование антибиотиков произвели революцию в поддержке здоровья инфекционных больных, заболевания которых вызваны патогенными бактериями. Рибосома является основной мишенью антибиотиков. Известно, что более пятидесяти процентов из них связывают и блокируют функцию бактериальной рибосомы. В области исследований и разработок антибиотиков, рентгено-структурный метод анализа структуры рибосом зарекомендовал себя как передовой метод исследования механизма действия антибиотиков и разработки новых терапевтических кандидатов, некоторые из которых уже находятся на рынке лекарственных средств.

Решением структуры эукариотической рибосомы с высоким разрешением в 2011 году методом рентгено-структурного анализа, кристаллография открыла новую область исследования ингибиторов трансляции и регуляторов эукариотических рибосом.

Исследования таких соединений представляют интерес по разным причинам. С одной стороны, анализ методом кристаллографии специфичных для эукариот ингибиторов позволяет выяснить механизм их действия. С другой стороны, позволяет исследовать правила видовой специфичности. Растет количество природных соединений выделенных из вторичных метаболитов, продуцируемых различными морскими организмами, растениями, почвенными и другими микроорганизмами, которые проявляют ингибирующий эффект особенно против эукариотических рибосом. Сравнение результатов этих исследований с бактериальными ингибиторами позволило определить структурные элементы рибосомы, ответственные за видовую специфичность.

Одна из целей таких исследований связана с разработкой новых подходов для понимания функции рибосомы. Как показывают многочисленные исследования с использованием бактериальных антибиотиков, ингибиторы рибосом представляют собой особо важные зонды для блокирования механизма трансляции на каждом этапе. Возможность селекции и анализа этих функциональных промежуточных звеньев имеют решающее значение для полного понимания процесса трансляции на атомарном уровне.

Специфичные для эукариот ингибиторы представляют особый интерес для разработки новых классов противoinфекционных препаратов для удовлетворения растущих медицинских потребностей в борьбе с патогенными для человека грибами и

паразитами. В дополнение, предварительные результаты и клинические испытания таких ингибиторов показывают, что возможно использование их для противоопухолевого лечения и терапии, при некоторых генетических заболеваниях. Действительно некоторые молекулы могут выступать в качестве регуляторов эукариотической рибосомы для «проскальзывания» преждевременных стоп-кодонов, обнаруживаемых в генетических заболеваниях, восстанавливая синтез полноразмерного функционального белка.

Центры связывания рибосомных ингибиторов. Чтобы получить общее представление о механизмах действия ингибиторов эукариотической рибосомы и создать основу для разработки лекарственных препаратов, мы определили 16 кристаллических структур рибосомы *S.cerevisiae* в комплексах с 12 эукариот-специфичными и 4 ингибитора широкого спектра действия на высоком разрешении. Неспецифичные ингибиторы нацелены на пептидилтрансферазный центр на большой субчастице (бластицидин S), декодирующий центр (генетицин G418) и участок связывания мРНК-тРНК на малой субчастице (пактамицин, эдеин). В список эукариот-специфичных ингибиторов вошли циклогексимид, лактимидомицин, филлантозид, Токсин Т-2, дезоксиниваленол, веррукарин А, нарциклазин, ликорин, нагилактон С, анисомицин, гомогаррингтонин и криптоплеурин (Рис. 7).

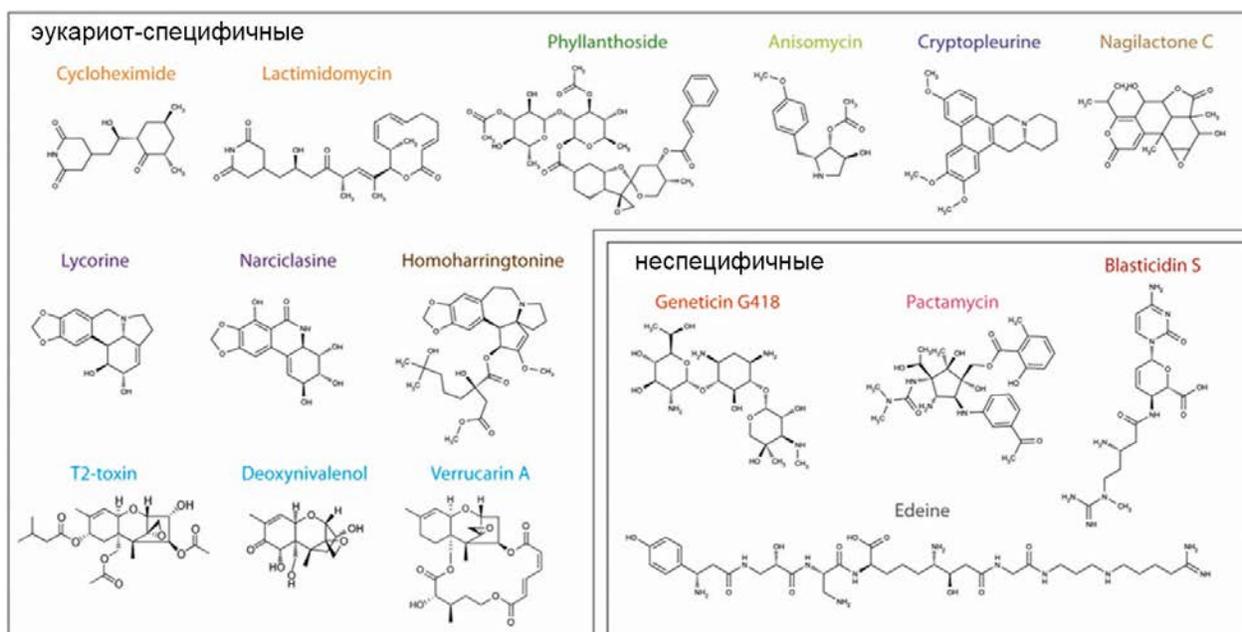


Рис. 7. Химические структуры 16 низкомолекулярных ингибиторов использованных в кристаллографических исследованиях. Циклогексимид и лактимидомицин широко используются в лабораторных исследованиях механизма трансляции. Гомогаррингтонин доступен для лечения хронического миелолейкоза. Ликорин и нарциклазин являются алкалоидами, которые известны своими лечебными и токсичными свойствами. Токсин Т-2, дезоксиниваленол и веррукарин являются широко распространенными представителями

микотоксинов. Аминогликозид генетицин (G418) способствует считыванию преждевременных стоп кодонов.

Наши исследования иллюстрируют химическое разнообразие малых молекул ингибиторов эукариотических рибосом. Все они были обнаружены в непосредственной близости от участков связывания мРНК и тРНК на большой и малой субчастицах (Рис. 8). В отличие от бактериальных антибиотиков, ни один из них не был расположен в пептидном туннеле, который коррелирует с увеличением числа рРНК модификаций в этой области эукариотической рибосомы. Хотя дрожжевая 80S рибосома содержит 1,4 МДа дополнительного веса, по сравнению с весом бактерий, примечательно, что все эукариот-специфические ингибиторы связываются с консервативными функциональными участками. Это наблюдение подчеркивает значительную роль одиночных нуклеотидных замен и возможно модификаций при формировании эукариот-специфичности.

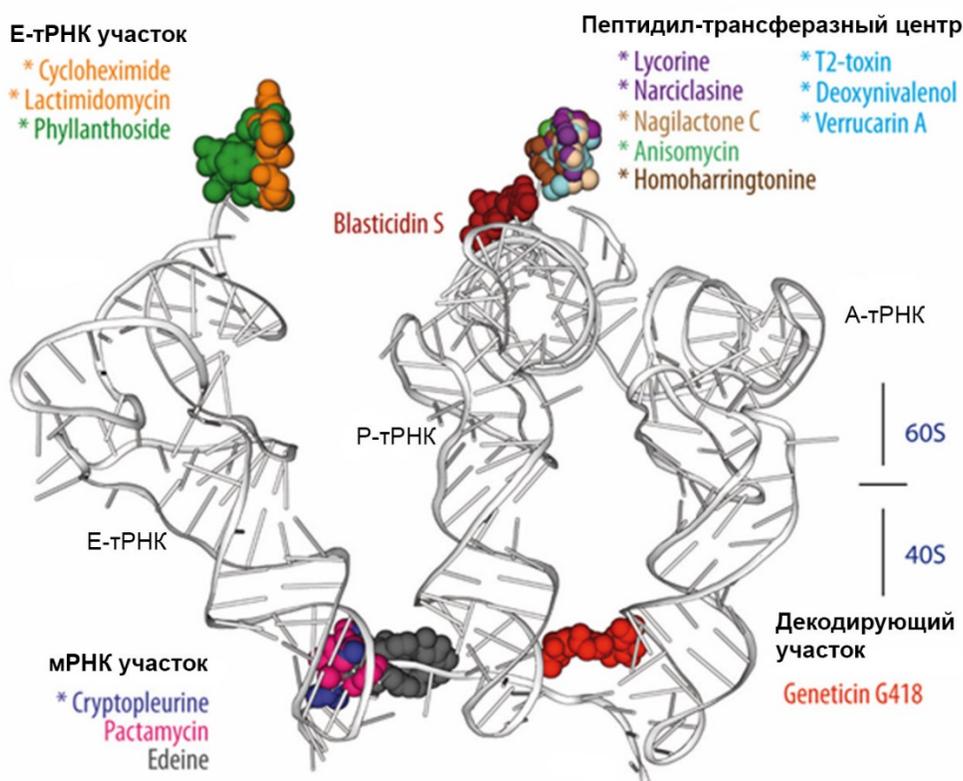


Рис. 8. Участки связывания ингибиторов на рибосоме дрожжей. Участки связывания могут быть сгруппированы по четырем функциональным областям: участок связывания тРНК и пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) на большой субчастице (60S) и центр декодирования (ЦД) и канал для связывания мРНК на малой субъединице (40S). Структуры А, Р и Е тРНК изображены серым цветом. Эукариот-специфические ингибиторы отмечены звездочкой.

Е-тРНК связывающий участок. Глутаримидные ингибиторы, циклогексимид и лактимидомицин, связываются в Е-участке большой субчастицы в кармане, образованном консервативными нуклеотидами 25S рРНК и эукариот-специфическим белком еL42. Циклогексимид взаимодействует исключительно с тремя нуклеотидами рРНК (G92, C2764 и U2763) через пять прямых водородных связей. Кроме того, стэкинг взаимодействие наблюдается между одним атомом кислорода глутаримидной группы и ароматическим кольцом C2764. Нуклеотиды, которые координируют циклогексимид, они же образуют участок связывания ССА-конца Е-тРНК. Наложение структуры Е-тРНК и циклогексемида показывает, что их участки связывания перекрываются. На самом деле, консервативный аденозин на 3' конце тРНК полностью накладывается на циклогексимид.

Лактимидомицин несет дополнительное лактоновое кольцо, которое расположено поверх еL42 и направленный к внутренней поверхности субчастицы. Химически глутаримиды не похожи на филлантозид, напоминающий тРНК, который вступает в контакт с теми же нуклеотидами рРНК и взаимодействует с белком еL42.

Строгая селективность ингибиторов Е-участка эукариот видимо объясняется наличием двух бактериально-специфичных нуклеотидов рРНК, которые препятствуют связыванию ингибиторов. Для локализации положения тРНК на большой субчастице, мы решили структуру рибосомы дрожжей в комплексе с три-нуклеотидом ССА, который имитирует акцепторный конец деацелированной тРНК. Эти структуры объясняют предыдущие биохимические данные, показывающие, что циклогексимид и лактимидомицин конкурируют со связыванием ССА-конца тРНК в Е-участок большой субъединицы. Филлантозид, вероятно, имеет аналогичный механизм ингибирования.

Рибосомный белок еL41, по-видимому, формирует общую полость, но не участвует непосредственно в связывании циклогексемида. Известно, что природные мутанты белка еL41 придают дрожжам устойчивость к циклогексимиду. Единственное изменение в еL41 в положении 56 (пролин на глутамин) резко меняет чувствительность к ингибитору. В хорошем согласии со структурой, боковой остаток глутамина в этом положении мешает связыванию циклогексемида. В дополнение к белку еL41, еще одна мутация устойчивости к циклогексимиду была выявлена в белке еL29, консервативном белке, расположенном в непосредственной близости к участку связывания ингибитора. Глутамин в положении 38 белка еL29 окружен несколькими молекулами растворителя, которые связываются с двумя нуклеотидами рРНК Е-участка (G92 и C2764). Наличие отрицательного заряда в этой области, который образуется в результате мутации Q38E, приводящей к устойчивости к циклогексимиду, может нарушить сеть взаимодействия молекул растворителя и, следовательно, изменить конформацию нуклеотидов рРНК Е-участка.

Пептидил-трансферазный Центр. Мишенью большинства антибиотиков является ПТЦ - каталитический центр рибосомы, расположенный на большой субчастице, состоящий исключительно из высоко консервативных нуклеотидов рибосомной РНК. В реакции образования пептидной связи требуется наличие двух субстратов, это аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК, которые должны быть правильно ориентированы в А- и Р- участках пептидилтрансферазного центра, соответственно. В отличие от Бластицидина S, который

связывается в Р участке большой субъединицы бактерий, архиа и эукариот, были обнаружены ингибиторы, которые связываются с А участком пептидил-трансферазного центра. Примечательно, что химически разнообразные ингибиторы имеют один и тот же участок связывания. При связывании некоторые ингибиторы А-участка вызывают сходные структурные перестроения в непосредственной близости, которые происходят в радиусе 15 Å от центра пептидилтрансферазы. Общая структурная основа ингибиторов трихотеценов, представлена Т-2 токсином, дезоксиниваленолом и веррукарином А определяет все основные контакты с нуклеотидами рРНК в связывающем участке. В отличие от трихоценов, три других ингибитора (ликорин, нарциклазин и гомогаррингтонин) принимают различную конформацию при связывании в А участке.

Если оставить в стороне структурные исследования, то большой класс ингибиторов трихотеценов вызывает особый интерес. Трихотецены-это широко распространенные микотоксины, продуцируемые грибами. Эти токсины оказывают тяжелое воздействие на зерновые культуры ответственные за значительную потерю урожая, а также серьезные заболевания у человека и животных, которые могут привести к смерти после употребления злаков. Трихотецены - это большая группа, состоящая примерно из 200 различных молекул. Т2-токсин является простейшим представителем трихотеценов. Трихотецены являются сильными ингибиторами трансляции мРНК у эукариот. Было показано, что вероятно они ингибируют рибосому в А-участке ПТЦ. Этот вывод был подтвержден мутацией резистентности в белке uL3 (W255C), в котором мутировавшие остатки находятся в непосредственной близости от ПТЦ.

Токсин Т2 связывается с А- участком ПТЦ. Большая часть его структуры занимает места между двумя нуклеотидами А2820 и С2821 (А2451 и С2452). Хотя ПТЦ полностью состоит из нуклеиновой кислоты, рибосомный белок uL3 является наиболее близким к ней. Только 7,5 Å отделяет триптофан 255 белка uL3 от токсина Т2.

Токсин Т2 препятствует позиционированию аминоацил-тРНК в А-участке ПТЦ. Наложение тРНК на А-и Р-участки, полученные из бактериальных рибосомных структур, показывает, что Токсин Т2 значительно перекрывается с аминокислотной частью ацилированной тРНК.

Структура А-участка ПТЦ отличается у бактерий и эукариот. В бактериях U2504 образует неканоническую пару с С2452. У эукариот это взаимодействие отсутствует, и в свою очередь U2873 (U2504) смещается и формирует стекинг с А2397 (который является цитозином в бактериях (С2055)). В результате происходит разрушение базовой пары и переориентация U2873 (U2504) у эукариот, что позволяет связывать Токсин Т2.

Декодирующий центр. Декодирующий центр рибосомы образует геометрически ограниченную область, в которой располагается антикодоновая петля аминоацил-тРНК в соответствии с кодоном мРНК расположенным в А участке рибосомы. У бактерий антибиотики аминогликозиды изменяют точность трансляции и ингибируют транслокацию путем нарушая конформации нуклеотидов кодирующего центра. Кроме того эта активность может подавлять преждевременные прерывания трансляции вызванные стоп- мутациями, что может быть использовано для лечения наследственных расстройств. Участок

связывания аминогликозидов расположен на спирали 44 из 18S рРНК, которая является частью центра декодирования, содержащей консервативные нуклеотиды A1755 (A1492) и A1756 (A1493). В непосредственной близости находятся два нуклеотида, которые различаются между бактериями и эукариотами, но идентичны в дрожжах и у человека: G1645 (A1408) и A1754 (G1491). Большой класс аминогликозидов можно разделить на три подгруппы согласно их химическим структурам: канамицины, неомицины и гентамицины. В качестве представителя канамицинов мы выбрали генетицин (G418) с высоким сродством к эукариотической рибосоме. Генетицин связывается в аминогликозидный участок и индуцирует «выпячивание» нуклеотидов A1755 и A1756. Структура показала стекнинг взаимодействия между кольцом I генетицина и специфичными для эукариот нуклеотидами G1645 и A1754.

Хотя некоторые аминогликозиды проявляют активность широкого спектра действия как против бактерий, так и против эукариот, большинство из них слабо или неактивны против эукариотических рибосом. Мы показали, что конформация G1645, которая отличается от конформации A1408 в бактериях, действует как барьер на эукариотической рибосоме запрещающий аккомодацию аминогликозидов, несущих аминогруппу в кольце I. В соответствии с этим наблюдением канамицины и гентамицины содержащие аминогруппу или углеродную боковую цепь в этом положении имеют ограниченное действие на эукариотическую рибосому. Тем не менее, некоторые неомицины, таких как паромомицин, содержат гидроксил в этом положении и сохраняют слабую активность к эукариотическим рибосомам. Таким образом второй структурный барьер для связывания неомицина объясняется смещением A1754 у эукариот из-за неканонического взаимодействия с C1646. Следовательно A1754 может иногда мешать аккомодации гидроксильной группы в кольце III, которая имеется в неомицинах, что согласуется с биохимическими данными.

Участки связывания мРНК и тРНК. Появление дополнительных участков в рРНК и в белках, а также появление новых белков, привели к важному ремоделированию малой субчастицы эукариот, которая служит платформой для многочисленных белковых факторов и активно участвует в процессе инициации трансляции. Во время инициации субчастица связывается с мРНК и перемещается по нетранслируемой области до стартового кодона. В бактериях эдеин связывается между Р-участком и Е-участком малой субчастицы и ухудшает связывание инициаторной тРНК с Р-участком во время инициации. В рибосоме дрожжей эдеин связывается с тем же самым участком рядом с мРНК, но принимает другую конформацию, чем на бактериальной 30S субчастице. Участок связывания эдеина образован нуклеотидами 18S рРНК, расположенными на пути мРНК. Эдеин по-разному влияет на трансляцию у прокариот и у эукариот в соответствии с тем, что механизмы инициации заметно отличаются друг от друга. Действительно, эдеин мешает распознаванию стартового кодона мешая непрерывному сканированию матрицы 40S субчастицей и мешая ассоциации рибосомных субчастиц.

Пактамицин и криптоплерин связываются с Е участком частично перекрываясь с участком связывания эдеина. Оба ингибитора находятся на месте связывания мРНК и взаимодействуют с рибосомой через «стекинг-взаимодействие» с G904 нуклеотидом 18S

pРНК. Пактамицин ингибитор широкого спектра действия и связывается с рибосомой бактерий и эукариот. Однако, криптолерин был описан как специфический ингибитор эукариот. Структура криптолерина, связанного с дрожжевой рибосомой не позволяет объяснить природу его специфичности. Расположение пактамицина и криптолерина подразумевает, что они могут мешать транслокации лигандов из Р-участка в Е-участок.

Кристаллографические исследования 16 ингибиторов дают полное описание участков связывания с рибосомой дрожжей на атомарном уровне. Были выявлены общие принципы нацеленности ингибиторов на специфические участки и даны первые объяснения селективности и устойчивости видов. Связываясь исключительно с функциональными участками на обеих субчастицах, низкомолекулярные ингибиторы нарушают работу рибосом во время цикла трансляции.

Подобно антибиотикам, действующим против бактериальной рибосомы, ингибиторы 80S рибосом являются сложными инструментами для изучения синтеза белка в эукариотах. Наши исследования объясняют общие принципы взаимодействия ингибиторов с рибосомой и создают основу для структурного «проектирования» новых лекарств. Наши структуры будут способствовать развитию следующего поколения антибиотиков со сниженными побочными эффектами и новых терапевтических средств против инфекционных заболеваний, раковых заболеваний и генетических нарушениях, вызванных преждевременным окончанием трансляции. Таким образом, рентгено-структурный анализ высокого разрешения 80S рибосом открывает новую область исследований. Большое количество ингибиторов рибосом, безусловно, еще предстоит обнаружить и проанализировать.

Рибосомные ингибиторы как потенциальные лекарства против раковых заболеваний. Натуральные ингибиторы синтеза эукариотических белков имеют значительный терапевтический потенциал для лечения широкого спектра раковых заболеваний человека. В качестве главного примера можно привести сообщение, что в 2012 году в США Администрация контроля лекарств и продуктов питания (FDA) одобрила первый ингибитор трансляции, натуральный алкалоид гомогарингтонин для лечения хронического миелолейкоза.

Е-тРНК связывающий участок. Циклогексимид и лактимидомицин широко используется в лабораторных условиях для ингибирования трансляции эукариот. Циклогексимид и лактимидомицин, проявляют сильное антипролиферативное действие путем ингибирования трансляции в эукариотических клетках. Хотя механизм ингибирования был хорошо изучен биохимическими методами, появление детальной структурной информации из кристаллографических исследований открывает дверь к разработке более селективных ингибиторов на основе понимания критических межмолекулярных взаимодействий (Рис. 9).

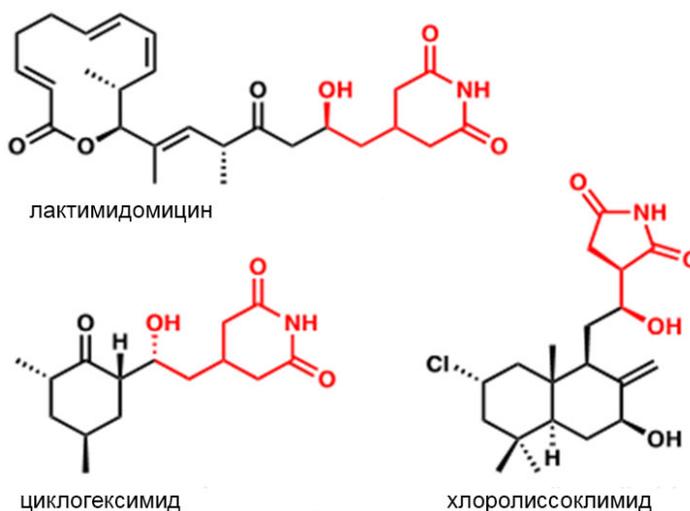


Рис. 9. Структурные формулы циклогексимида, лактимидомицина и хлоролиссоклимида.

Ранее было показано, что хлоролиссоклимид и дихлоролиссоклимид являются мощными цитотоксинами в отношении мышинового лейкоза и карциномы человека. Хлоролиссоклимид первоначально был выделен из асцидии (морские брызги) и было показано, что он является ингибитором на этапе трансляции эукариот. В этом же исследовании авторы отметили структурную гомологию между хлоролиссоклимидом и хорошо изученным ингибитором трансляции циклогексими́дом. Ясно, что такие глутаримиды как циклогексими́д, лактимидомицин и сукцинимиды, как хлоролиссоклимид структурно схожи (Рис. 9). Механизм действия глутаримидов и участок связывания на эукариотической рибосоме полученный с помощью рентгено-структурного анализа был описан выше.

Учитывая структурное сходство между ингибиторами и сходство в их биохимических свойствах, казалось вероятным предположить, что хлоролиссоклимид будет связываться с рибосомой. В результате, мы определили кристаллическую структуру рибосомы *S. cerevisiae* в комплексе с синтетическим образцом ингибитора при максимальном разрешении 3.0Å (Рис. 10). Как и предполагалось, участок связывания перекрывается с ССА концом E- tRNA на большой субчастице, как ранее показано для глутаримидов. Химическая структура хлоролиссоклимида была однозначно вписана в карту электронной плотности. Кристаллическая структура была получена путем совместной кристаллизации с молярным отношением ингибитор к 80S рибосоме как 30 к 1. При конечной концентрации 33 мкМ мы не наблюдали никакого вторичного связывания на рибосоме. Сравнение структур комплекса и вакантной рибосомы не выявила никаких конформационных изменений в ингибиторе и в E участке связывания. Важно отметить, что структурная информация может быть использована при разработке противоопухолевых лекарств, так как рибосомы человека и мыши в данной области структурно почти идентичны рибосоме дрожжей, используемых в наших исследованиях

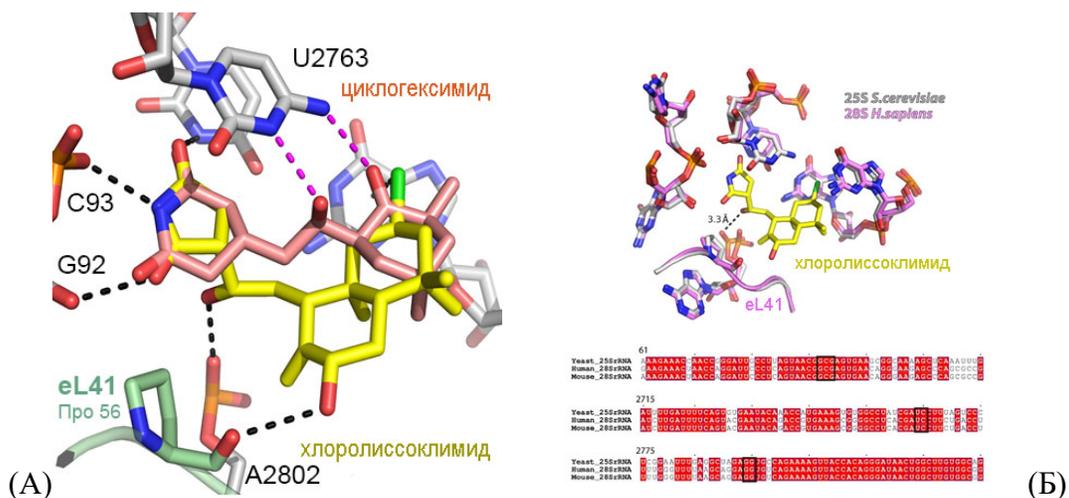


Рис. 10. (А) Сравнение взаимодействия циклогексимида и хлоролиссоклимида с рибосомой в Е участке (циклогексимид розовый, хлоролиссоклимид желтый). Прямые контакты происходят с нуклеотидами G92, C93, U2763, A2802 и G2794 25S рРНК. Хлоролиссоклимид имеет дополнительную водородную связь с рибосомным белком eL41. (Б) Структурная гомология Е участка рибосомы дрожжей и человека позволяет использовать дрожжевую рибосому для исследования ингибиторов рибосомы человека.

Сравнение участков связывания циклогексимида и лактимидомицина и хлоролиссоклимида показало аналогичную сеть взаимодействий ингибиторов и консервативных нуклеотидов 25S рРНК, а именно G92, C93 и U2763 (Рис. 10). Хлоролиссоклимид дополнительно взаимодействует с A2802 рРНК. Мы также наблюдали две особенности взаимодействия хлоролиссоклимида с рибосомой. С7-гидроксильная группа, присутствующая на кольце, образует водородную связь с Pro56 белка eL41, и таким образом отличается от большинства других известных ингибиторов, которые исключительно связываются с рРНК. Наконец, хлор, расположенный на кольце декалина взаимодействует с G2794 25S рРНК (и, в меньшей степени, с G2793). Атом хлора находится в сторону от центра шестичленного кольца и, по-видимому, образует галоген-π взаимодействие с остатком гуанина.

Пептидил-трансферазный центр. Морские натуральные продукты широко используются для выделения новых лекарственных препаратов, которые также могут использоваться в химической биологии благодаря их способности влиять на функции специфических белков мишеней. Агеластатин А (AgIА) - это структурно уникальный бромированный алкалоид, выделенный из морской губки *Agelas dendromorpha*. Было показано, что он обладает мощной цитотоксической активностью в отношении некоторых раковых клеточных линий. Однако, несмотря на свою многообещающую

противоопухолевую активность, молекулярный механизм действия Агеластатина А (AglA) оставался долгое время неизвестным.

С помощью бесклеточной системы трансляции *in vitro* мы показали, что AglA ингибирует синтез белка. Далее мы обнаружили, что AglA ингибирует именно стадию элонгации трансляции в дрожжах. Эти эксперименты позволили предположить, что пептидилтрансферазный центр является потенциальным участком связывания ингибитора. Рентгено-структурный анализ и молекулярное моделирование были использованы для решения структуры комплекса эукариотической рибосомы и AglA. Результаты подтвердили наше предположение о рибосоме, как молекулярной мишени AglA, и таким образом был предложен механизм ингибирования трансляции, как основной механизм противоопухолевой активности Агеластатина.

Полученная структура высокого разрешения позволила нам окончательно определить место связывания AglA в рибосоме, а именно как А-участок пептидилтрансферазного центра. AglA образует множество связей с рРНК включая: U2875, U2869 и U2873 и A2820 и C2821. Сравнение структуры ПТЦ пустой рибосомы и структуры комплекса позволило определить изменения ориентации ряда нуклеотидов при связывании Агеластатина А. Нуклеотид U2875 25S рРНК претерпевает серьезную перестройку и отворачивается от центра ПТЦ, в то время как соседние нуклеотиды сохраняют свою исходную конформацию. Кроме того, AglA индуцирует перемещение A2820, C2821 и, в меньшей степени, перемещение соседних нуклеотидов, для того чтобы создать устойчивые контакты с большой субчастицей. Более того, переворачивание вверх U2875 в структуре индуцирует смещение A2404, вероятно, в результате стерических взаимодействий между этими нуклеотидными основаниями.

Алкалоиды, выделенные из растений семейства *Amaryllidaceae* имеют огромный потенциал в качестве терапевтических средств для лечения болезней человека. Ранее мы исследовали нарциклазин (NAR) в комплексе с эукариотической рибосомой и показали его взаимодействия с ПТЦ. Нарциклазин и гемантамин имеют схожие химические структуры. Гемантамин (HAE) был изучен как новое противоопухолевое средство благодаря своей способности нарушать устойчивость раковых клеток к апоптозу. Биохимические эксперименты предположили, что мишенью гемантамина является рибосома. Кроме того оказалось, что гемантамин также ингибируют специфически биогенез (созревание) рибосомы, запуская реакцию ядрышкового стресса и приводит к стабилизации белка р53 в раковых клетках.

Мы использовали рентгено-структурный анализ для решения структуры гемантамина в комплексе с рибосомой дрожжей. Эта структура показывает, что гемантамин связывается с А-участком на большой субчастице в пептидил-трансферазном центре. Оказалось, что имеются существенные различия в связывании нарциклазина и гемантамина с консервированными нуклеотидами 25S рРНК в А-участке ПТЦ. Гемантамин зажат между нуклеотидами U2875 и C2821, где ароматическое кольцо ингибитора, может образовывать «стекинг» с нуклеотидными основаниями. Для этого при связывании ингибитора меняется

положение основания нуклеотида U2875. Кроме того, образуется водородная связь с основанием U2873.

Используя полученную структуру, мы стремились понять причину, по которой гемантамин не эффективен против бактерий, хотя прокариотические и эукариотические рибосомы имеют в основном консервативные нуклеотиды в ПТЦ. В бактериях имеется замена U2822 на A2453, где меняется положение основания. Эта мутация не позволяет консервативному нуклеотиду U2504 в бактериях (U2873 в дрожжах) принять конформацию аналогично той, что и в рибосоме дрожжей. Вследствие этого, U2504 явно стерически столкнется с гемантамином, что препятствует его связыванию с бактериальной рибосомой.

Участок связывания мРНК и тРНК. Было известно, что Амикумацин А - это антибиотик, который, нацелен на бактериальные рибосомы и ингибирует транслокацию тРНК и мРНК. Оказалось, что он ингибирует также трансляцию в дрожжах. Мы определили структуру комплекса Амикумацина А в комплексе дрожжевой рибосомой с разрешением 3.1 Å. Также показали, что линии раковых клеток человека более восприимчивы к ингибированию этим соединением по сравнению с не раковыми. Этот результат может быть использован в качестве отправной точки для разработки производных амикумацина для клинических испытаний.

Результаты исследований комплекса Амикумацина А с дрожжевой рибосомой показали, что молекула ингибитора связывается с Е-участком малой рибосомной субчастицы. Амикумацин А взаимодействует в основном с остатками рРНК в спиралях h23 и h24. Он участвует в «стекинге» с G904 (G693 в бактериях) спирали h23. Антибиотик формирует также водородные связи с нуклеотидами U999 (U788), U1769 (U1506), A1005 (A794) и C1006 (C795).

Мы сравнили структуру Амикумацина А, связанного с пустой рибосомой дрожжей, с аналогичной структурой бактериальной рибосомы из *Thermus thermophilus* содержащей матрицу и тРНК. Оказалось, что конформация, принятая амикумацином А в бактериальных и эукариотических рибосомах, очень похожа. Примечательно, что контакты Амикумацина А с эукариотической рибосомой сохраняются и при отсутствии функциональных лигандов. Различия бактериальных и дрожжевых рибосомах были обнаружены только в белках uS11 и uS7, которые участвуют в формировании канала для связывания матричной РНК в Е-участке рибосомы.

Аминогликозиды как потенциальные лекарства для лечения генетических заболеваний, вызванных появлением стоп кодонов в смысловых генах. Трансляция гена завершается, когда один из трех стоп-кодонов, UAA, UGA или UAG, входит в рибосомный А-участок (Рис. 11). В отличие от смысловых кодонов, которые распознаются тРНК, стоп-кодона узнаются белковыми факторами терминации. Эффективность терминации трансляции зависит от конкуренции за узнавание стоп-кодонов между факторами терминации и тРНК, которые могут ошибаться при декодировании. У эукариот два фактора терминации, eRF1 и eRF3. Белок eRF1 распознает стоп-кодона через свой N-концевой домен и осуществляет пептидил-тРНК гидролиз путем активации

пептидилтрансферазного центра рибосомы через свои консервативные домены NIKS и GGQ (Рис. 11).

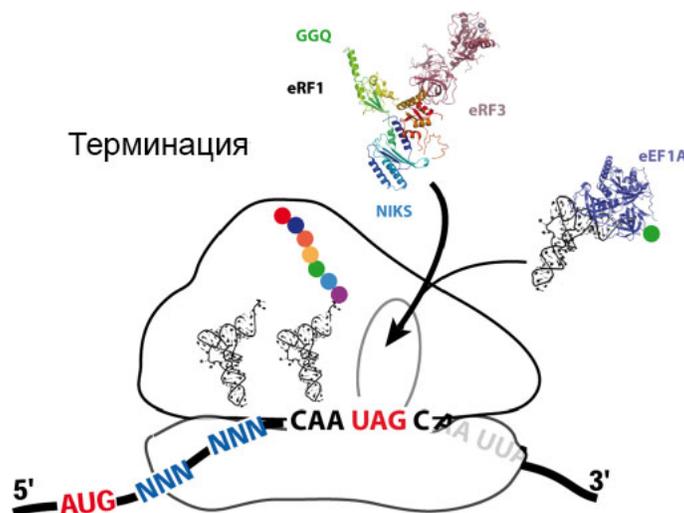


Рис. 11. Принципиальная схема конкуренции между окончанием трансляции и прохождением стоп кодона. Стоп кодон (UAG) расположен в А-участке, тогда как Р - и Е – участки заняты тРНК. Естественный супрессор терминации - тРНК в комплексе с фактором элонгации eEF1A. Антибиотики аминогликозиды способствуют связыванию рибосомой естественных супрессорных тРНК.

Многие генетические и раковые заболевания связаны с мутациями в генах и появлением стоп кодона в середине смысловой последовательности мРНК. В этих случаях рибосома не может синтезировать полную цепь белка, а завершает синтез белка в месте появления первого стоп кодона. В целом антибиотики аминогликозиды вызывают появление ошибок при работе рибосомы, и в том числе могут способствовать сделать ошибку при считывании «стоп» кодона и вместо фактора терминации связывать неправильную тРНК. Использование препаратов для индуцирования ошибок для продолжения трансляции проложило бы путь к разработке многих новых протоколов лечения. Действительно, известно, что такие заболевания составляют более 10% наследственных заболеваний, включая муковисцидоз, гемофилию и мышечную дистрофия Дюшенна. Было показано, что паромомицин и гентамицин частично восстанавливают синтез функционального белка из мутантного гена со «стоп» мутацией в клетках млекопитающих. В настоящее время много исследовательских групп занимаются поиском химических компонентов, обладающих такими свойствами для проведения клинических испытаний. Наша группа исследовала центры связывания ряда аминогликозидных антибиотиков (паромомицин, генетицин (G418), гентамицин и ТС007) на дрожжевой рибосоме. Предполагалось, что антибиотики будут связываться в Декодирующем участке рибосомы. Однако было обнаружено несколько дополнительных центров связывания для каждого антибиотика внутри больших и малых субъединиц. Наличие нескольких центров связывания аминогликозидов на рибосоме может объяснить побочные эффекты от

лекарственных средств, разработанных на основе этих антибиотиков, Конечно же, нарушение митохондриальной трансляции так же рассматривается, как одна из основных причин побочных эффектов.

Первичные участки связывания локализованы в декодирующем центре рибосомы. Например, паромомицин связывается внутри спирали 44 малой субчастицы, также как в бактериальной рибосоме. Кольцо I находится в «стекинге» с нуклеотидом A1754. Нуклеотиды A1756 и A1755 «выпячены» из спирали 44. Гентамицин, другой антибиотик исследуемого ряда, также связывается внутри спирали 44, но его взаимодействия с РНК отличается от паромомицина. Он располагается выше по спирали 44 и взаимодействует с нуклеотидами G1642, C1641 и A1756.

Анализ вторичных участков связывания аминогликозидов показал, что они могут связываться с пептидным туннелем рибосомы. Пептидный туннель начинается с пептидилтрансферазного центра, функцию которого могут ингибировать эти антибиотики. Мы наблюдали связывание с пептидным туннелем гентамицина, G418 и TC007. Паромомицин не был обнаружен в туннеле, вероятно, что только аминогликозиды с тремя кольцами могут связываться в этом участке. Суперпозиция со структурой эритромицина в туннеле большой субчастицы *Haloarcula marismortui* показало, что аминогликозиды связываются с противоположными сторонами стенки выходного туннеля.

Так же было показано, что группа аминогликозидов паромомицин, генетицин (G418) и гентамицин связываются с E-участком малой рибосомной субчастицы, мешая связыванию или сканированию матричной РНК или транслокации.

Результаты структурных исследований аминогликозидов с эукариотической рибосомой послужат основой для изучения молекулярных механизмов действия аминогликозидов у эукариот. Хотя нарушение митохондриальной трансляции рассматривается, как одна из основных причин побочных эффектов, вызванных аминогликозидами в эукариотических клетках, наши данные расширяют область объяснений их действия на рибосомы. Вероятно, аминогликозиды с одной стороны помогают рибосомам допускать ошибки при трансляции, а с другой стороны могут блокировать работу рибосом, ингибируя ее основные функции.

Заключение. Использование структурной информации эукариотических рибосом на атомарном уровне для разработки новых лекарственных средств находится на начальной стадии развития. Наша группа остается пока единственной в мире, кто проводит исследования рибосомных ингибиторов на эукариотической рибосоме методом рентгеноструктурного анализа. Наш подход позволяет получать достоверную информацию о деталях взаимодействия будущих лекарств с мишенью. Сложность метода остается по-прежнему в кристаллизации рибосом и получении структурных данных высокого разрешения. Последнее время появились работы по изучению рибосомных комплексов с перспективными ингибиторами для разработки лекарств методом крио-электронной микроскопии. Перспективность этого направления связана с менее сложным способом сбора структурной информации рибосомных комплексов высокого разрешения. Однако, достоверность этих результатов нуждается в дальнейших доказательствах концепции. При

этом основным барьером является невозможность работы с большим количеством образцов одновременно и длительность обработки данных.

ВЫВОДЫ

1. Решена кристаллическая структура дрожжевой рибосомы 2.8 – 3.0 Å разрешения.
2. Построена атомарная модель 80S рибосомы эукариот, содержащая 79 индивидуальных рибосомных белков и 5500 нуклеотидов четырех рибосомных РНК.
3. Исследованы центры связывания главных функциональных лигандов таких, как матричная РНК и транспортная РНК на рибосоме и предложены механизмы функционирования 16 ингибиторов эукариотической рибосомы.
4. Предложены правила специфичности для ингибиторов декодирующего центра и пептидил-трансферазного центра эукариотической рибосомы.
5. Исследованы центры связывания на рибосоме и предложены механизмы функционирования 4 новых веществ, как потенциальных антираковых препаратов.
6. Исследованы центры связывания на рибосоме 4 аминогликозидов, как потенциальных ингибиторов для лечения генетических заболеваний, связанных с появлением «стоп» мутаций в смысловых последовательностях генов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ по теме диссертации в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science

1. Pellegrino S., Meyer M., Könst Z.A., Holm M., Voora V.K., Kashinskaya D., Zanette C., Mobley D.L., Yusupova G., Vanderwal C.D., Blanchard S.C., **Yusupov M.** Understanding the role of intermolecular interactions between lissoclimides and the eukaryotic ribosome // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47(6), P. 3223, IF 11.501 (Web of Science).
2. Pellegrino S., Meyer M., Zorbas C., Bouchta S.A., Saraf K., Pelly S.C., Yusupova G., Evidente A., Mathieu V., Kornienko A., Lafontaine D.L.J., **Yusupov M.** The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth // *Structure.* 2018. V. 26(3), P. 416, IF 4.862 (Web of Science).
3. Prokhorova I., Altman R.B., Djumagulov M., Shrestha J.P., Urzhumtsev A., Ferguson A., Chang C.T., Yusupov M., Blanchard S.C., Yusupova G. Aminoglycoside Interactions and Impacts on the Eukaryotic Ribosome // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017. V. 114(51), P.10899, IF 9.412 (Web of Science).

4. Erales J., Marchand V., Panthu B., Gillot S., Belin S., Ghayad S.E., Garcia M., Laforêts F., Marcel V., Baudin-Baillieu A., Bertin P., Couté Y., Adrait A., Meyer M., Therizols G., **Yusupov M.**, Namy O., Ohlmann T., Motorin Y., Catez F., Diaz J.J. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. V. 114(49), P. 12934, IF 9.412 (Web of Science).
5. Könst Z.A., Szklarski A.R., Pellegrino S., Michalak S.E., Meyer M., Zanette C., Cencic R., Nam Horne D.A., Pelletier J., Mobley D.L., Yusupova G., **Yusupov M.**, Vanderwal D.C. Synthesis Facilitates an Understanding of the Structural Basis for Translation Inhibition by the Lissoclimides // *Nat Chem*. 2017. V. 9(11), P.1140, IF 21.687 (Web of Science).
6. McClary B., Zinshteyn B., Meyer M., Jouanneau M., Pellegrino S., Yusupova G., Schuller A., Reyes J.C.P., Lu J., Guo Z., Ayinde S., Luo C., Dang Y., Romo D., **Yusupov M.**, Green R., Liu J.O. Inhibition of Eukaryotic Translation by the Antitumor Natural Product Agelastatin A // *Cell Chem Biol*. 2017. V. 24(5), P. 605, IF 7.739 (Web of Science).
7. Yusupova G., **Yusupov M.** Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017. 372(1716), P.1716, Review. IF 6.139 (Web of Science).
8. Melnikov S., Mailliot J., Rigger L., Neuner S., Shin B., Yusupova G., Dever T., Micura R., **Yusupov M.** Molecular insights into protein synthesis with proline residues // *EMBO Rep*. 2016. V. 17(12), P. 1776, IF 7.497 (Web of Science).
9. Prokhorova I.V., Akulich K.A., Makeeva D.S., Osterman I.A., Skvortsov D.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Yusupova G., **Yusupov M.M.**, Dmitriev S.E. Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome // *Sci Rep*. 2016. V. 6(1), P.27720, IF 3.998 (Web of Science).
10. Melnikov S., Mailliot J., Shin B.S., Rigger L., Yusupova G., Micura R., Dever T.E., **Yusupov M.** Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome // *J Mol Biol*. 2016. V. 428(18), P. 3570, IF 4.760 (Web of Science).
11. Mailliot J., Garreau de Loubresse N., Yusupova G., Meskauskas A., Dinman J.D., **Yusupov M.** Crystal Structures of the uL3 Mutant Ribosome: Illustration of the Importance of Ribosomal Proteins for Translation Efficiency // *J Mol Biol*. 2016. V. 428(10), P.2195, IF 4.760 (Web of Science).
12. Yusupova G. and **Yusupov M.** Ribosome biochemistry in crystal structure determination // *RNA*. 2015. V. 21(4), P.771, IF 5.350 (Web of Science).
13. Garreau de Loubresse N., Prokhorova I., Holtkamp W., Rodnina M.V., Yusupova G., **Yusupov M.** Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome // *Nature*. 2014. V. 513(7519), P. 517. IF 42.778 (Web of Science).
14. Yusupova G., **Yusupov M.** High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome // *Annu Rev Biochem*. 2014. V. 83(2), P. 467, IF 25.787 (Web of Science).
15. Ban N., Beckmann R., Cate J.H., Dinman J.D., Dragon F., Ellis S.R., Lafontaine D.L., Lindahl L., Liljas A., Lipton J.M., McAlear M.A., Moore P.B., Noller H.F., Ortega J.,

- Panse V.G., Ramakrishnan V., Spahn C.M., Steitz T.A., Tchorzewski M., Tollervey D., Warren A.J., Williamson J.R., Wilson D., Yonath A., **Yusupov M.** A new system for naming ribosomal proteins // *Curr Opin Struct Biol.* 2014. V. 24(1), P.165, IF 6.908 (Web of Science).
16. Jenner L., Melnikov S., Garreau de Loubresse N., Ben-Shem A., Iskakova M., Urzhumtsev A., Meskauskas A., Dinman J., Yusupova G. and **Yusupov M.** Crystal structure of the 80S yeast ribosome // *Curr Opin Struct Biol.* 2012. V. 22(2), P. 759, IF 6.908 (Web of Science).
 17. Melnikov S., Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Jenner L., Yusupova G., **Yusupov M.** One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes // *Nat Struct Mol Biol.* 2012 V. 19(6), P. 560, IF 11.98 (Web of Science).
 18. Ben-Shem, A., Jenner L., Yusupova G., **Yusupov M.** Crystal structure of the eukaryotic 80S ribosome // “Ribosomes. Structure, Function, and Dynamics”. Rodnina/Wintermeyer/Green (Eds). Springer-Verlag/Vien, Austria. 2011. P. 75.
 19. Ben-Shem A., Garreau De Loubresse N., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G., **Yusupov M.** The complete structure of the eukaryotic ribosome at 3Å resolution // *Science.* 2011. V. 334(6062), P. 1524, IF 41.846 (Web of Science).
 20. Ben-Shem A., Jenner L., Yusupova G., **Yusupov M.** Crystal structure of eukaryotic ribosome // *Science.* 2010. V. 330(6008), P.1203, IF 41.846 (Web of Science).
 21. Jenner L., Demeshkina N., Yusupova G., **Yusupov M.** Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step // *Nat Struct Mol Biol.* 2010. V. 17(9), P. 1072, IF 11.98 (Web of Science).
 22. Demeshkina N., Jenner L., Yusupova G., **Yusupov M.** Interactions of the ribosome with mRNA and tRNA // *Current Opinion in Structural Biology.* 2010. V. 20(5), P.1, IF 6.908 (Web of Science).
 23. Jenner L., Demeshkina N., Yusupova G., **Yusupov M.** Structural aspects of messenger RNA maintenance by the ribosome // *Nat Struct Mol Biol.* 2010. V. 17(5), P.555, IF 11.98 (Web of Science).
 24. Simonetti A., Marzi S., Jenner L., Myasnikov A.G., Romby P., Yusupova G., Klaholz B.P. **Yusupov M.** Structural view to initiation of translation in bacteria (Review) // *Cell.Mol.Life Sci.* 2009. V. 66(3), P. 423, IF 7.030 (Web of Science).
 25. Simonetti A., Marzi S., Myasnikov A.G., Fabbretti A., **Yusupov M.**, Gualerzi C.O., Klaholz B.P. Structure of the 30S translation initiation complex // *Nature.* 2008. V. 455(7211), P. 416, IF 42.778 (Web of Science).
 26. Jenner L., Rees B., **Yusupov M.** and Yusupova G. mRNA conformations in the ribosomal E-site revealed by X-ray crystallography // *EMBO reports.* 2007. V. 8(9), P. 846, IF 7.497 (Web of Science).
 27. Marzi S., Myasnikov A.G., Serganov A., Ehresmann C., Romby P., **Yusupov M.** and Klaholz B.P. Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to a dedicated site on the ribosome // *Cell.* 2007. V. 130(6), P. 1019, IF 38.637 (Web of Science).

28. Yusupova G., Jenner L., **Yusupov M.** Messenger RNA movement on the ribosome // *Molecular Biology (Russia)*. 2007. V. 41(), P. 240, IF 1.023 (Web of Science).
29. Yusupova G., Jenner L., Rees B., Moras D., **Yusupov M.** Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome // *Nature*. 2006. V. 444(7117), P. 391, IF 42.778 (Web of Science).
30. **Yusupov M.** X-ray structure and function study of the ribosome // Puglisi JD, Ed. *Structure, Dynamics and Function of Biological Macromolecules and Assemblies*. IOS Press. 2005. P. 157.
31. Rees B., Jenner L., **Yusupov M.** Bulk-solvent correction in large acromolecular structures // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2005. V. 61(9), P. 1299, IF 5.226 (Web of Science).
32. Jenner L., Romby P., Rees B., Schulze-Briese C., Springer M., Ehresmann C., Ehresmann B., Moras D., Yusupova G., **Yusupov M.** Translational Operator of mRNA on the Ribosome: How Repressor Protein excludes Ribosome Binding // *Science*. 2005. V. 308(5718), P. 120, IF 41.846 (Web of Science).
33. Noller H.F., **Yusupov M.**, Yusupova G., Baucom A., Lieberman K., Lancaster L., Dallas A., Fredrick K., Earnest T.N., Cate J.H.D. The Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution and its Interactions with Functional Ligands // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: The Ribosome*, V. 66. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001. P. 57.
34. Noller H.F., **Yusupov M.M.**, Yusupova G.Z., Baucom A., Cate J.H. Translocation of tRNA during protein synthesis // *FEBS Lett*. 2001. V. 514(1), P. 11. Review. IF 3.057
35. Yusupova G.Z., **Yusupov M.M.**, Cate J.H., Noller H.F. The path of messenger RNA through the ribosome // *Cell*. 2001. V. 106(2), P. 233, IF 38.637 (Web of Science).
36. **Yusupov M.**, Yusupova G., Baucom A., Liberman K., Lancaster L., Earnest T., Cate J, Noller H. Crystal structure of the ribosome at 5.5Å resolution // *Science*. 2001. V. 292(5518), P. 883, IF 41.846 (Web of Science).
37. Noller H., Cate J., Dallas A., Culver G., Earnest T., Green R., Holmberg L., Joseph S., Lancaster L., Lieberman K., Merryman C., Newcomb L., Samaha R., Ahsen U., **Yusupov M.**, Yusupova G., Wilson K. Studies on the structure and function of ribosomes by combined use of chemical probing and X-ray crystallography // Garrett RA, Douthwaite SR, Liljas A, Matheson AT, Moore PB, Noller HF, Eds, *The Ribosome: structure, function, antibiotics and cellular interactions*. American Society for microbiology, Washington, D.C. 2000. P. 129.
38. Culver G., Cate J., Yusupova G., **Yusupov M.** and Noller H. Identification of an RNA-Protein Bridge Spanning the Ribosomal Subunit Interface // *Science*. 1999. V. 285(5436), P. 2133, IF 41.846 (Web of Science).
39. Cate J., **Yusupov M.**, Yusupova G., Earnest T. and Noller H. X-ray Crystal structures of 70S Ribosome Functional Complexes // *Science*. 1999. V. 285(5436), P. 2095, IF 41.846 (Web of Science).

40. Yusupova G., **Yusupov M.**, Spirin A., Ebel J.P., Moras D., Ehresmann C. and Ehresmann B. Formation and crystallization of *Thermus thermophilus* 70S ribosome/ tRNA complexes // FEBS Lett. 1991. V. 290(1), P. 69, IF 3.057 (Web of Science).
41. **Yusupov M.M.**, Garber M.B., Vasiliev V.D. and Spirin A.S. *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies // Biochimie. 1991. V. 73(7), P. 887 (Review), IF 3.413 (Web of Science).
42. Trakhanov S.D., **Yusupov M.M.**, Shirokov V.A., Garber M.B., Mitschler A., Ruff M, Tierry J.C. and Moras D. Preliminary X-ray investigation of 70S ribosomal crystals from *Thermus thermophilus* // J.Mol.Biol. 1989. V. 209(2), P. 327, IF 4.760 (Web of Science).
43. **Yusupov M.M.**, Tischenko S.V. Trakhanov S.D., Riazantsev S.N., Garber M.B. A new crystallin form of 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus* // FEBS Lett. 1988. V. 238(2), P. 113, IF 3.057 (Web of Science).
44. Trakhanov S.D., **Yusupov M.M.**, Agalarov S.C., Garber M.B., Riazantsev S.N., Tischenko S.V. and Shirokov V.A. Crystallization of 70S ribosome and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus* // FEBS Lett. 1987. V. 220(1), P. 319, IF 3.057 (Web of Science).
45. **Yusupov M.M.**, Trakhanov S.D., Barinin V.V., Boroviagin B.D., Garber M.B., Sedelnikova S.E., Selivanova O.M., Tischenko S.V., Shirokov V.A. and Edintsov M.M. Crystallization of the 30S subunits of *Thermus thermophilus* ribosomes // Dokl. Akad. Nauk (USSR). 1987. V. 292(1), P. 1271, IF 0.548 (Web of Science).
46. Gogia Z.V., **Yusupov M.M.** and Spirina T.N. Structure of *Thermus thermophilus* ribosomes. Method of isolation and purification of ribosomes // Molekul. biol. (USSR). 1986. V. 20(1), P. 519, IF 1.023 (Web of Science).