

PRINCIPLES OF RIBOSOME FUNCTION

A. S. SPIRIN

A model of translating ribosome is based on the following principles: 1) genetic and enzymatic functions of the ribosome are distinctly split between the ribosomal subunits; 2) periodic changes of the conformational state provide conditions for intraribosomal movements of mRNA and tRNAs; 3) catalysis of non-covalent reactions requires GTP hydrolysis in order to allow a release from a conformational transition state.

В статье рассматривается модель транслирующей рибосомы, основанная на следующих принципах: 1) генетические и энзиматические функции рибосомы разделены между двумя субчастицами; 2) изменения конформационного состояния рибосомы обеспечивают условия для перемещений мРНК и тРНК; 3) катализ нековалентных реакций требует гидролиза ГТФ.

ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РИБОСОМ

А. С. СПИРИН

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Биосинтез белка имеет два аспекта: химический и генетический. Принципиальным моментом является то, что в природе белок строится из аминокислот не посредством их прямой конденсации с освобождением воды или одновременной полимеризации на матрице, а путем последовательного добавления аминокислотных остатков к одному из концов растущей полипептидной цепи (удлинения) с одновременным сканированием матричного полинуклеотида (мРНК), задающего порядок добавления различных аминокислотных остатков. Три последовательные химические реакции приводят к включению (добавлению) аминокислоты в полипептидную цепь строящегося белка:

- 1) аминокислота + АТФ \longrightarrow
 \longrightarrow аминоацил-аденилат + пирофосфат,
- 2) аминоацил-аденилат + тРНК' \longrightarrow
 \longrightarrow аминоацил-тРНК' + АМФ,
- 3) пептидил(*n*)-тРНК + аминоацил-тРНК' \longrightarrow
 \longrightarrow тРНК + пептидил(*n* + 1)-тРНК'.

Первая реакция – активация аминокислоты за счет образования ангидридной связи между ее карбоксилем и фосфатом адениловой кислоты – и вторая реакция – акцептирование аминоацильного остатка молекулой тРНК с образованием сложноэфирной связи между карбоксилем аминокислоты и гидроксилом концевого рибозного остатка тРНК – происходят вне рибосомы, и обе реакции катализируются ферментом аминоацил-тРНК-синтетазой. Третья реакция – транспептидация, то есть перенос карбоксильной группы растущего полипептида от гидроксила рибозного остатка тРНК, принесшей предыдущий аминокислотный остаток в цепь, на аминогруппу аминокислотного остатка аминоацил-тРНК – осуществляется в рибосоме и катализируется самой рибосомой, без постороннего фермента. Таким образом, именно молекулы аминоацил-тРНК являются формой поступления аминокислотных остатков в рибосомы. Генетическая сторона биосинтеза белка определяется тем, что поступление аминоацил-тРНК в рибосому строго детерминировано матричной РНК (мРНК), являющейся копией гена, и порядок чередования кодирующих триплетов (кодонов) вдоль цепи мРНК однозначно задает

структуру синтезируемого белка. Для этого рибосома сканирует цепь мРНК по триплетам и последовательно выбирает из раствора аминокил-тРНК с соответствующими аминокислотными остатками, выбрасывая отработанные, деацилированные тРНК.

Итак, в процессе биосинтеза белка рибосома: а) принимает кодированную генетическую информацию от ДНК в виде мРНК и расшифровывает ее, б) катализирует образование пептидных связей в реакции транспептидации и в) передвигает цепь мРНК и молекулы тРНК. Таким образом, рибосома – сложная белоксинтезирующая частица, обладающая одновременно генетической (декодирующее устройство), энзиматической (рибосома как фермент пептидилтрансфераза) и механической (молекулярная машина) функциями. Очевидно, что эти функции базируются на специфической структуре рибосомы как рибонуклеопротеидной частицы. Принципы структуры рибосомы были рассмотрены в предыдущей статье [1]. Эта статья – попытка сформулировать принципы функционирования рибосомы на основании наших знаний о структурных особенностях рибосомы и ее функциональных проявлениях.

ПРИНЦИП № 1: РАЗДЕЛЕНИЕ ДЕКОДИРУЮЩЕЙ И ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ ФУНКЦИЙ МЕЖДУ СУБЧАСТИЦАМИ

Трансляция начинается с того, что мРНК, синтезируемая на ДНК в качестве копии одной из двух цепей последней, связывается с рибосомной частицей. При этом рибосомная частица (у прокариот прямо и непосредственно, а у эукариот после некоторого скольжения вдоль некодирующей части мРНК) специфически взаимодействует с началом кодирующей нуклеотидной последовательности мРНК. Этап связывания мРНК с рибосомной частицей и нескольких последующих событий, приводящих к образованию первой пептидной связи, называется *инициацией трансляции*. Вслед за инициацией рибосома последовательно “читает” цепочку мРНК по тройкам (триплетам) нуклеотидов по направлению к 3'-концу, наращивая (удлиняя) полипептидную цепочку аминокислотными остатками; этот этап собственно трансляции называется *элонгацией*. Наконец, достигнув специального нуклеотидного триплета – стоп-кодона, или кодона терминации, – рибосома освобождает синтезированную полипептидную цепочку белка: происходит *терминация трансляции*. Эпицикл трансляции, включающий инициацию, элонгацию и терминацию, схематически представлен на рис. 1.

Генетические функции малой рибосомной субчастицы

Характерным моментом инициации трансляции является то, что на этом этапе участвуют не целые

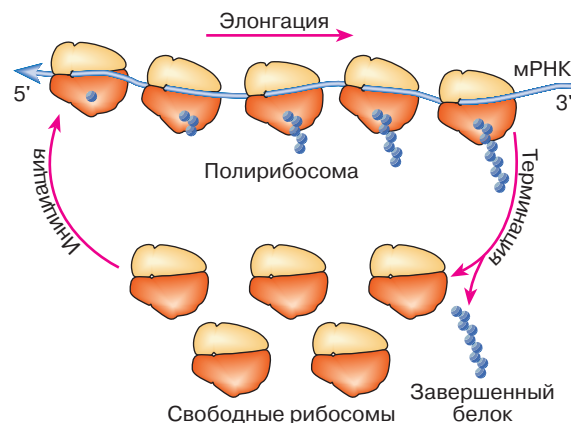


Рис. 1. Эпицикл трансляции: 1) свободная рибосомная частица ассоциирует с мРНК у начала ее кодирующей последовательности нуклеотидов и начинает трансляцию на специальном иницирующем кодоне, с участием специальной инициаторной тРНК (*инициация трансляции*); 2) затем считывает кодирующую последовательность нуклеотидов по триплетам (кодонам) в направлении от 5'-конца к 3'-концу и соответственно наращивает полипептидную цепь по одной аминокислоте, последовательно удлиняя ее С-конец (*элонгация*); 3) и, дойдя до специального стоп-триплета (терминирующего кодона), прекращает трансляцию и освобождает законченную полипептидную цепь белка (*терминация трансляции*). Рибосомные частицы, закончившие трансляцию и диссоциировавшие от мРНК, снова готовы инициировать трансляцию и войти в эпицикл.

После инициации, двигаясь по цепи мРНК, рибосома все больше отодвигается от 5'-конца, и в результате ранее занимаемый ею отрезок мРНК становится свободным и способным связывать другую рибосому. Эта вторая рибосома тоже начинает трансляцию и двигается вслед за первой рибосомой, отодвигается от 5'-концевого отрезка и дает возможность третьей рибосоме сесть на мРНК и начать трансляцию и т.д. Таким путем, двигаясь вдоль мРНК друг за другом, несколько рибосом одновременно считывают одну и ту же запись и, следовательно, синтезируют идентичные полипептидные цепи (разумеется, в каждый данный момент полипептидные цепи на разных рибосомах находятся на разной стадии завершенности – чем ближе к 3'-концу мРНК, тем завершеннее). Такая структура, в которой одна мРНК ассоциирована со многими рибосомами, ее одновременно транслирующими, называется *полирибосомой*

рибосомы, а их отдельные субчастицы. Другими словами, для того чтобы инициировать трансляцию, рибосома должна быть диссоциирована на две составляющие ее неравные субчастицы. Для этого клетка располагает специальными механизмами, обеспечивающими диссоциацию рибосом после терминации трансляции. Именно малая субчастица рибосомы (30S у прокариот и 40S у эукариот), и только она, связывается с мРНК, то есть служит *первичным приемником генетической информации* для белоксинтезирующего аппарата. Лишь впоследствии,

при завершении этапа инициации трансляции, к ней присоединяется большая субчастица (50S у прокариот и 60S у эукариот), образуя полную рибосомную частицу (70S у прокариот и 80S у эукариот), которая и будет производить элонгацию.

В процессе элонгации рибосома удерживает мРНК и движется относительно ее (или протягивает ее сквозь себя) в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Удержание мРНК на рибосоме есть целиком и полностью функция малой рибосомной субчастицы, в то время как большая субчастица с мРНК никак не взаимодействует. Соответственно последовательное сканирование кодирующей последовательности мРНК (считывание генетической информации) в ходе элонгации осуществляется на малой субчастице транслирующей рибосомы.

Механизм потриплетного сканирования мРНК в ходе элонгации предполагает участие молекул тРНК, которые взаимодействуют прежде всего с малой рибосомной субчастицей. Малая субчастица в составе полной транслирующей рибосомы имеет два тРНК-связывающих участка, обозначаемых как *аминоацил-тРНК-связывающий участок (А-участок)* и *пептидил-тРНК-связывающий участок (Р-участок)*. На этапе элонгации Р-участок всегда занят остатком тРНК. Рассмотрение элементарного акта элонгации удобно начать с момента, когда Р-участок занят молекулой пептидил-тРНК (тРНК, несущая растущую полипептидную цепь), а А-участок вакантен и содержит лишь некий нуклеотидный триплет (кодон) мРНК, пока не взаимодействующий ни с каким триплетом (антикодоном) тРНК (рис. 2, состояние I). Такая рибосома готова (компетентна) связать аминоксил-тРНК, антикодон которой комплементарен триплету (кодону), установленному в А-участке. При наличии около рибосомы такой аминоксил-тРНК происходит первый шаг элементарного элонгационного цикла – кодон-специфическое связывание аминоксил-тРНК с А-участком. Теперь рибосома несет “старую” пептидил-тРНК в Р-участке и новоявленную аминоксил-тРНК в А-участке, которые расположены рядом, бок о бок (рис. 2, состояние II). Следовательно, в результате кодон-антикодонного взаимодействия мРНК с тРНК на малой субчастице рибосомы произошло *декодирование* триплета мРНК: именно тот аминокислотный остаток, который был привешен к тРНК с комплементарным антикодоном, оказался в рибосоме.

Далее молекулы пептидил-тРНК и аминоксил-тРНК, расположенные рядом в рибосоме, реагируют друг с другом: пептидильный остаток переносится на аминокислотную группу молекулы аминоксил-тРНК. Это второй шаг элементарного элонгационного цикла – *транспептидация*, когда полипептидная цепь удлиняется на одну аминокислоту – на ту, которую принесла тРНК, связавшаяся с А-участком. А сама тРНК, принеся эту аминокислоту, так и

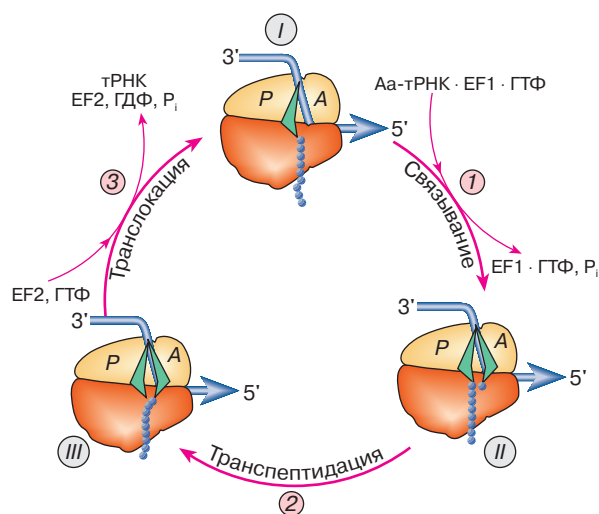


Рис. 2. Элементарный элонгационный цикл рибосомы, в результате которого прочитывается один триплет (кодон) мРНК и образуется одна пептидная связь (добавляется одна аминокислота к растущему полипептиду).

В каждый данный момент в ходе элонгации рибосома сидит на участке кодирующей последовательности мРНК и удерживает молекулу пептидил-тРНК. Пептидил-тРНК есть растущая полипептидная цепь, ковалентно присоединенная своим С-концом к тРНК, которая и принесла последний (С-концевой) аминокислотный остаток растущему пептиду. Когда пептидил-тРНК занимает Р-участок рибосомы (состояние I), рибосома может *связывать молекулу аминоксил-тРНК*, соответствующую кодону, установленному на данный момент в А-участке (шаг 1). В результате удерживаемая рибосомой пептидил-тРНК и вновь связанная аминоксил-тРНК оказываются в рибосоме бок о бок (состояние II). Рибосома (ее пептидил-трансферазный центр на большой субчастице) катализирует реакцию *транспептидации* между этими двумя субстратами рибосомы – пептидил-тРНК и аминоксил-тРНК: пептидильный остаток переносится от “своей” тРНК на аминокислотную группу аминоксил-тРНК, тем самым удлиняясь на одну аминокислоту на С-конце (шаг 2). Теперь в Р-участке осталась деацилированная тРНК, а в А-участке помещается остаток тРНК удлиненной пептидил-тРНК (состояние III). Следующий за этим акт транслокации состоит в том, что деацилированная тРНК выталкивается из Р-участка, а пептидил-тРНК (ее остаток тРНК) перемещается вместе со связанным с ней кодоном мРНК из А-участка в Р-участок (шаг 3). В итоге А-участок освобождается, и в нем устанавливается следующий кодон мРНК. Цикл завершился. Повторение таких циклов по числу кодонов мРНК создает полный процесс элонгации. Следует отметить, что шаг 1 (связывание аминоксил-тРНК) катализируется белком – фактором элонгации EF1 – с участием ГТФ, а шаг 3 (транслокация) – другим белком – фактором элонгации EF2 – и тоже с участием ГТФ. В ходе катализа ГТФ расщепляется (гидролизуется) до ГДФ и ортофосфата

осталась с ней связанной и, таким образом, связанной с удлиненным полипептидом (рис. 2, состояние III). В этом состоянии, однако, новообразованная пептидил-тРНК – точнее, ее остаток тРНК – занимает “не положенный ей” А-участок, а “сидит” в Р-участке деацилированная (без пептидильного или аминоацильного остатков) тРНК. Такое состояние называется претранслокационным. Дальше элонгация идти не может, пока не осуществится третий шаг элонгационного цикла – транслокация, которая выбросит деацилированную тРНК из Р-участка и переведет пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок вместе со связанным с ней кодоном мРНК. В результате в освободившемся А-участке на малой рибосомной субчастице установится следующий (новый) кодон мРНК. Цикл завершился, приведя к образованию одной пептидной связи и соответствующему удлинению растущего полипептида на одну аминокислоту, с одной стороны, и к прочтению одного кодона мРНК и перемещению мРНК на один триплет – с другой. Повторение таких элементарных циклов и создает процесс элонгации.

Таким образом, малая рибосомная субчастица в изолированном состоянии воспринимает копию гена в форме мРНК и инициирует процесс ее трансляции, а в ходе трансляции малая субчастица полной рибосомы удерживает мРНК на себе, декодирует ее

с помощью тРНК и последовательно перебирает ее кодоны и тРНК, используя механизм транслокации. Так как все это операции с генетическим материалом, то указанные функции малой рибосомной субчастицы могут быть определены как генетические.

Энзиматические функции большой рибосомной субчастицы

Когда пептидил-тРНК занимает Р-участок, а аминоацил-тРНК – А-участок на малой субчастице рибосомы (см. рис. 2, состояние II), концы остатков тРНК с присоединенными к ним аминоацильными остатками взаимодействуют с большой субчастицей рибосомы. Участок этого взаимодействия на большой субчастице является *пептидилтрансферазным центром* рибосомы: он катализирует реакцию транспептидации между пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК, то есть перенос карбоксильной группы пептидильного остатка на аминогруппу аминоацил-тРНК (рис. 3). В результате образуется новая пептидная связь, и пептидильный остаток становится на одну аминокислоту длиннее. Таким образом, большая субчастица транслирующей рибосомы выступает здесь как фермент, ответственный за образование пептидных связей и в целом за синтез

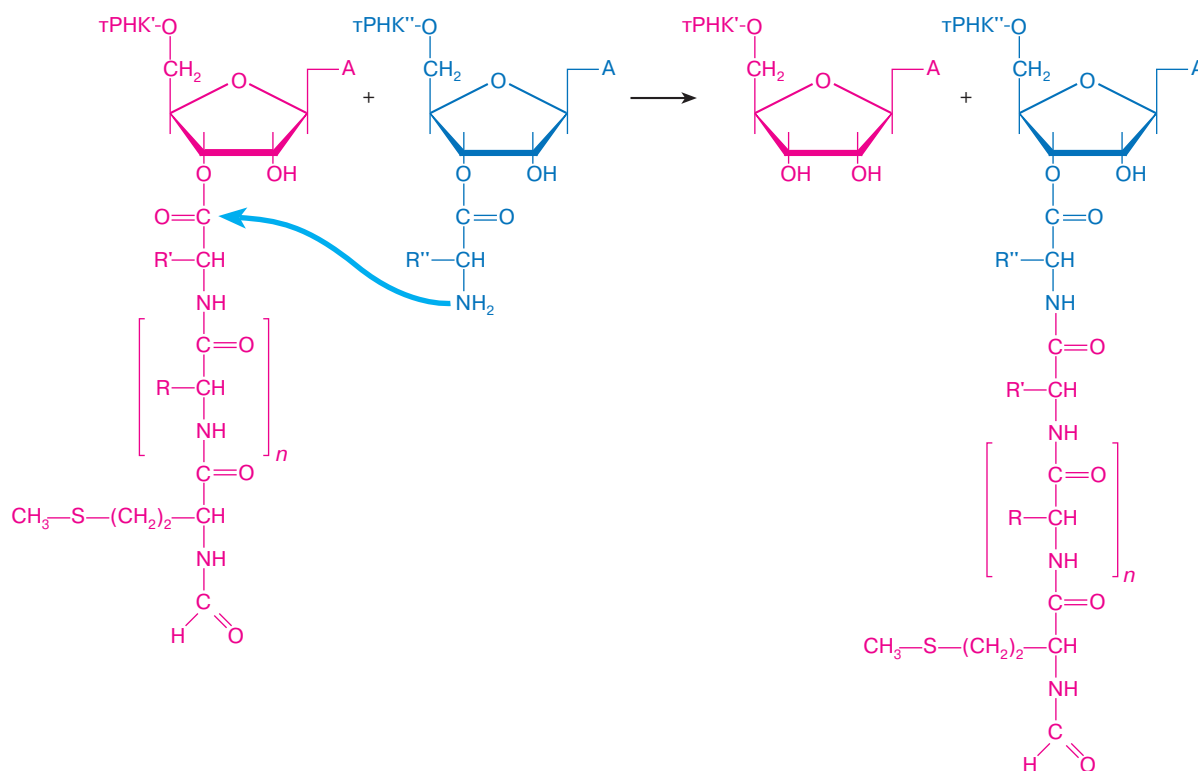


Рис. 3. Реакция транспептидации, катализируемая пептидилтрансферазным центром большой рибосомной субчастицы

(элонгацию) полипептидной цепи. Это главная энзиматическая функция рибосомы.

Следует отметить, что никакого отдельного от рибосомы белка-фермента, катализирующего образование пептидных связей на рибосоме, не существует. Не найдено и никакого специального белка в составе рибосомы, который бы обладал такой энзиматической функцией. Транспептидация катализируется пептидилтрансферазным центром самой рибосомы как интегральной частью большой рибосомной субчастицы, и основной вклад в организацию центра вносит, по-видимому, рибосомная РНК субчастицы.

Кроме катализа реакции транспептидации большая рибосомная субчастица определенным образом участвует в энзиматическом расщеплении (гидролизе) гуанозинтрифосфата (ГТФ) в процессе трансляции. Дело в том, что, как видно на рис. 2, первый и третий шаги элонгационного цикла идут с участием специальных нерибосомных белков — так называемых факторов элонгации EF1 и EF2. Эти белки являются катализаторами соответствующих нековалентных переходов — связывания аминоацил-тРНК и транслокации. Для такого катализа необходимым оказывается сопряженный гидролиз ГТФ. Именно большая рибосомная субчастица взаимодействует с факторами элонгации и индуцирует гидролиз ГТФ на них. Хотя сам ГТФазный центр находится не на рибосомной субчастице, а на белке — факторе элонгации, ее временная ассоциация с фактором существенна для формирования активного энзиматического ГТФазного центра.

Таким образом, существует четкое разделение труда между двумя неравными субчастицами рибосомы: малая субчастица выполняет генетические функции, будучи ответственной за прием и декодирование генетической информации, в то время как большая участвует в энзиматических реакциях в процессе трансляции. Схематическое изображение “разътой” рибосомы с распределением ее основных функциональных центров на двух субчастицах дано на рис. 4.

ПРИНЦИП № 2: КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ РИБОСОМЫ

Работа рибосомы в качестве “лентопротяжного механизма” (последовательное прочитывание цепи мРНК от одного конца к другому) в ходе элонгации (см. рис. 1) и ее способность перебрасывать сравнительно большие молекулярные массы (молекулы тРНК) из одного участка в другой в каждом элементарном элонгационном цикле (см. рис. 2, шаг 3) предполагают ее механическую подвижность. Взаимная подвижность двух рибосомных субчастиц может быть основным видом крупноблочной подвижности рибосомы в ходе работы, и имеются экспериментальные свидетельства в пользу такой по-

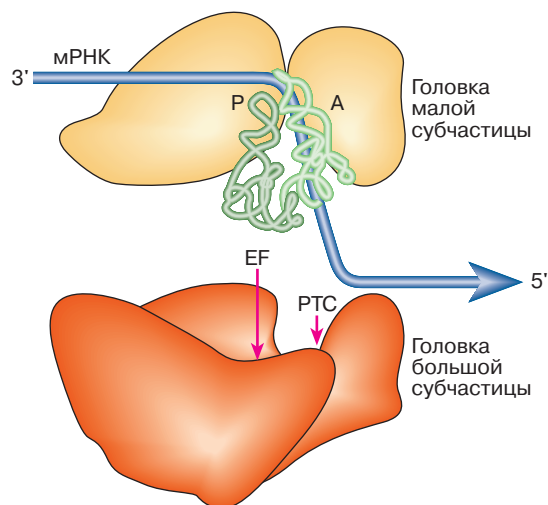


Рис. 4. Расположение функциональных центров на малой (вверху) и большой (внизу) субчастицах рибосомы. Цепь мРНК связана с малой субчастицей в районе ее “шеи” и протягивается через этот мРНК-связывающий центр в ходе трансляции от 5'-конца (направлен вниз и вправо) к 3'-концу (обращен вверх и влево). Две молекулы тРНК занимают А- и Р-участки на малой субчастице, будучи связаны своими антикодонами с двумя смежными кодонами мРНК в районе “шеи” малой субчастицы. Пептидилтрансферазный центр (РТС) расположен в районе “шеи” (в борозде под центральным выступом) большой субчастицы. Когда субчастицы ассоциированы, акцепторные концы двух тРНК с их аминоацильным и пептидилным остатками взаимодействуют с пептидилтрансферазным центром большой субчастицы. Факторы элонгации EF1 и EF2 связываются в районе палочкообразного бокового выступа большой субчастицы (на рисунке направлен на зрителя) со стороны, обращенной к малой субчастице

движности. Кроме того, существуют указания на подвижность “головки” малой рибосомной субчастицы относительно ее “тела” и на подвижность палочкообразного бокового выступа большой рибосомной субчастицы.

На рис. 2 схематически изображены три функциональных состояния транслирующей рибосомы с фиксированными положениями лигандов (тРНК) в А- и Р-участках и переходы между состояниями. Однако со структурно-молекулярной точки зрения переходы между состоянием I и состоянием II (кодонзависимое связывание аминоацил-тРНК) и особенно между состоянием III и состоянием I (транслокация) кажутся затруднительными без промежуточных состояний, где рибосомные лиганды имели бы некоторую свободу внутривнутририбосомных перемещений или были бы частично делокализованы. Необходимость промежуточных состояний вытекает из простого соображения: такие большие (с молекулярной точки зрения) лиганды, как тРНК, должны связываться с рибосомой несколькими

контактными точками своей поверхности (многоцентровое связывание), а одновременное образование или разрыв многих контактов должны сопровождаться большими кинетическими (энергетическими) барьерами, делающими такие процессы крайне медленными (маловероятными).

Конформационная подвижность рибосомы, и в первую очередь взаимная подвижность рибосомных субчастиц, позволяет разрешить эту проблему. На рис. 5 представлена модель, согласно которой рибосома при прохождении элонгационного цикла осциллирует между двумя конформационными состояниями: закрытым (сомкнутым) и открытым (разомкнутым). В сомкнутом состоянии рибосомные лиганды (тРНК) зажаты между субчастицами, связаны максимальным количеством контактов с рибосомой и не имеют внутририбосомной подвижности. В разомкнутом состоянии рибосомы лиганды более подвижны, контакты с рибосомой менее

полны, и имеется возможность их входа и выхода из рибосомы. Так, на первом этапе связывания аминоацил-тРНК рибосома должна быть открыта для приема лиганда. Возможно, это открытое состояние фиксируется фактором элонгации EF1. Далее EF1 уходит, рибосомные субчастицы плотно смыкаются, и аминоацильный конец связавшейся аминоацил-тРНК вступает в контакт с пептидилтрансферным центром большой субчастицы. В сомкнутом состоянии пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК тесно сближены, и между ними происходит реакция транспептидации. Теперь, чтобы выбросить деацелированную тРНК из рибосомы и дать свободу для перемещения остатка тРНК молекулы пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок, рибосому надо приоткрыть, в частности путем раздвигания субчастиц. Это может осуществляться фактором элонгации EF2. После ухода EF2 с рибосомы она снова смыкается и ждет прихода очередной аминоацил-тРНК с фактором элонгации EF1.

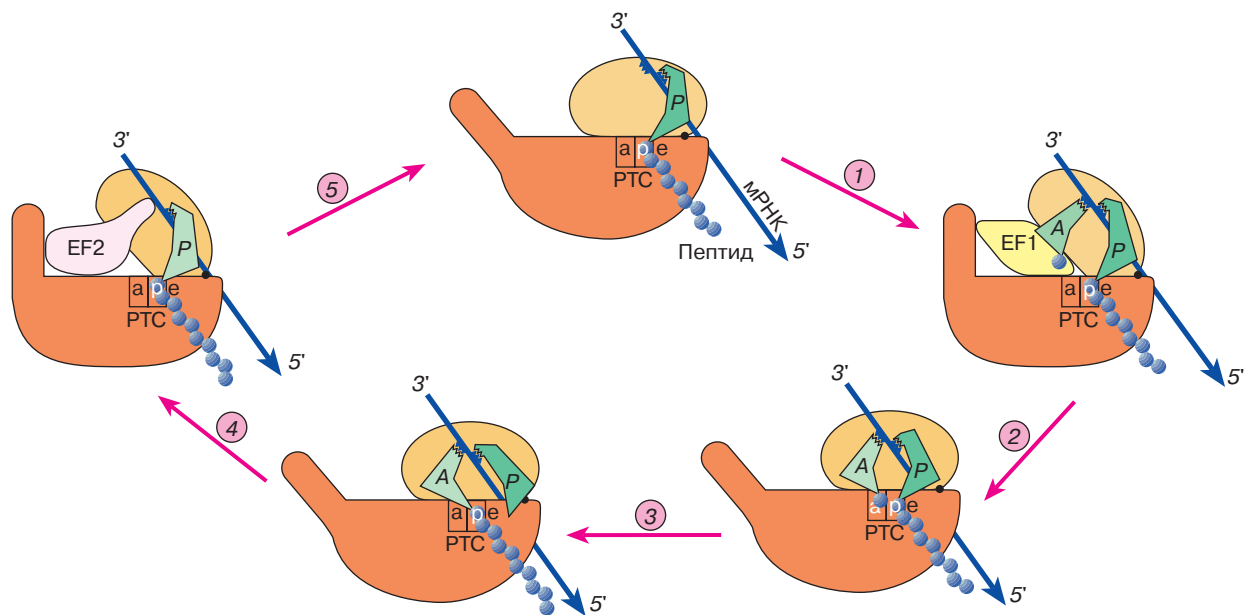


Рис. 5. Модель динамической работы рибосомы в элонгационном цикле (на данной схеме “головки” обеих рибосомных субчастиц обращены к зрителю). Модель постулирует, что две рибосомные субчастицы подвижно соединены друг с другом и способны к некоторому раздвиганию (размыканию) и сдвиганию (смыканию). Размыкание открывает функциональные центры на контактирующих поверхностях субчастиц, такие, как А-участок для приема аминоацил-тРНК, и способствует перемещению лигандов, например в ходе транслокации. Смыкание субчастиц запирает лиганды внутри рибосомы и приводит в тесный контакт субстраты для реакции транспептидации. Предполагается, что размыкание индуцируется факторами элонгации с ГТФ, а гидролиз ГТФ и уход факторов с рибосомы позволяют ей снова сомкнуться.

На рисунке представлено рассмотрение элонгационного цикла с точки зрения модели смыкания–размыкания: 1 – связывание аминоацил-тРНК с рибосомой требует размыкания, и фактор элонгации EF1 с ГТФ призван “открыть” рибосому; 2 – после расщепления ГТФ фактор элонгации EF1 покидает рибосому, а аминоацильный конец аминоацил-тРНК взаимодействует с пептидилтрансферным центром большой субчастицы и тем самым способствует смыканию субчастиц и запираению рибосомы; 3 – реакция транспептидации происходит в “закрытой” рибосоме между тесно сближенными группами двух субстратов – пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК; 4 – размыкание претранслокационной рибосомы промотируется фактором элонгации EF2 с ГТФ, что приводит к выходу деацелированной тРНК и смещению остатка тРНК молекулы пептидил-тРНК вместе с мРНК; 5 – гидролиз ГТФ и как следствие уход фактора элонгации EF2 снова дает возможность рибосоме сомкнуться. Таким образом, транслирующая рибосома в ходе элонгационного цикла осциллирует между сомкнутым и разомкнутым состояниями

Следует подчеркнуть, что процесс периодического смыкания–размыкания рибосомы является энергозависимым: факторы элонгации EF1 и EF2 взаимодействуют с рибосомой только будучи связанными с ГТФ (согласно модели, при этом взаимодействии происходит открывание рибосомы), а взаимодействие с рибосомой наводит ГТФазную активность, ГТФ гидролизуется, фактор элонгации теряет сродство к рибосоме и уходит, и рибосома закрывается. Таким образом, на каждое смыкание–размыкание рибосомы расходуется одна молекула ГТФ. Так как в каждом элонгационном цикле рибосома смыкается–размыкается дважды, то две молекулы ГТФ расходуются на каждый цикл. Это есть энергетическая плата за эффективное (быстрое и надежное) функционирование рибосомы как молекулярной машины.

ПРИНЦИП № 3: ГТФ-ЗАВИСИМЫЙ КАТАЛИЗ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ

Вместе с тем оказывается, что термодинамически все три шага элонгационного цикла – связывание аминоксил-тРНК, транспептидация и транслокация – это спонтанные процессы, сами по себе идущие с понижением свободной энергии. Действительно, аминоксил-тРНК может специфически, кодонзависимым образом связываться с рибосомой и образовывать нормальный функциональный комплекс (состояние II на рис. 2) при отсутствии фактора элонгации EF1 и ГТФ, хотя и значительно медленнее, чем в их присутствии (так называемое неэнзиматическое связывание аминоксил-тРНК). Транспептидация, как известно, всегда катализируется лишь самой рибосомой и является типичной экзергонической (идущей с большим понижением свободной энергии) реакцией. Претранслокационное состояние рибосомы (состояние III на рис. 2) термодинамически нестабильно и может медленно скатываться в посттранслокационное состояние спонтанно, без фактора элонгации EF2 и ГТФ (так называемая неэнзиматическая транслокация). В целом, когда в условиях *in vitro* (в бесклеточных системах) рибосомы снабжены лишь матричным полинуклеотидом и аминоксил-тРНК, возможна медленная неэнзиматическая, или бесфакторная, трансляция без каких-либо дополнительных источников энергии в виде ГТФ или АТФ.

Дело в том, что основным источником свободной энергии для производства полезной работы (синтез полипептида со строго заданной аминокислотной последовательностью) в процессе элонгации является реакция транспептидации (рис. 3). В этой реакции сложноэфирная связь молекулы пептидил-тРНК заменяется на пептидную связь в удлиненной пептидил-тРНК. Свободная энергия гидролиза сложноэфирной связи между аминокислотным остатком и рибозой тРНК оценивается величиной

от –7 до –8 ккал/моль, а свободная энергия гидролиза пептидной связи около –0,5 ккал/моль. Следовательно, чистый выигрыш свободной энергии в реакции транспептидации составляет около –7 ккал/моль, то есть сравним со свободной энергией гидролиза АТФ или ГТФ. Другими словами, транспептидация – экзергоническая реакция, способная “накормить” энергией работающую рибосому и обеспечить спонтанное прохождение элонгационного цикла.

Для чего же тогда потребляется ГТФ, да еще и по две молекулы на элонгационный цикл? Очевидно, не на производство полезной работы (в термодинамическом смысле слова). Показано, что гидролиз ГТФ в элонгационном цикле при участии рибосомы и факторов элонгации химически не сопряжен ни с какой другой ковалентной реакцией и не связан с образованием какого бы то ни было фосфорилированного интермедиата. Это прямая атака молекулы воды на пирофосфатную связь ГТФ, и освобождаемая свободная энергия гидролиза полностью диссипирует в тепло. Вместе с тем участие факторов элонгации и катализируемый ими гидролиз ГТФ очень сильно (на несколько порядков) увеличивает *скорость элонгации*. Это позволяет думать, что главная роль гидролиза ГТФ в элонгационном цикле чисто каталитическая, то есть *кинетическая*, а не термодинамическая.

Данное обстоятельство весьма необычно с энзиматической точки зрения. Ведь обычно подразумевается, что катализ, в том числе энзиматический катализ, ускоряет спонтанные реакции без какого-либо потребления дополнительной энергии – свободная энергия освобождается в результате самой катализируемой реакции. Однако вся теория энзиматического катализа разработана для ковалентных реакций. Ее суть состоит в том, что фермент имеет сродство к переходному состоянию катализируемой реакции. Тем самым за счет энергии сродства именно к переходному состоянию исходный субстрат изменяется и фиксируется белком-ферментом в этом состоянии. Энергетический барьер взят. Но образовавшийся комплекс фермента с переходным интермедиатом был бы тупиковым (непродуктивным), если бы интермедиат спонтанно не разваливался на продукты реакции с освобождением свободной энергии, компенсирующей энергию взаимодействия с ферментом. Таким образом, экзергоничность катализируемой реакции необходима для десорбции продукта с фермента.

В случае катализа конформационных превращений, каковой наблюдается в элонгационном цикле при EF1-прототируемом связывании аминоксил-тРНК и EF2-прототируемой транслокации (рис. 2 и 5), ситуация иная. Здесь, очевидно, белок-катализатор (EF1 или EF2) тоже имеет сродство к переходному конформационному состоянию рибосомы и тем самым за счет этой энергии взаимодействия фиксирует его. Далее рибосоме надо выйти из этого

комплекса, чтобы “упасть” в следующее (продуктивное) состояние. Это было бы невозможно — комплекс оказался бы ловушкой, тупиком, — если бы не участие ГТФ. Природа устроила так, что фактор элонгации может взаимодействовать с рибосомой только после ассоциации с ГТФ: молекула ГТФ за счет сродства к фактору изменяет его конформацию так, что он приобретает сродство к рибосоме. Следовательно, именно фактор элонгации с лигандом ГТФ фиксирует переходное конформационное состояние рибосомы. Но посадка фактора на рибосому индуцирует ГТФазную активность фактора, ГТФ гидролизуется, и как следствие фактор теряет сродство к рибосоме и уходит. Рибосома “падает с барьера” в термодинамически устойчивое состояние. Другими словами, энергия сродства фактора элонгации к переходному конформационному состоянию компенсируется сопутствующей ковалентной реакцией, идущей с понижением свободной энергии.

Таким образом, прямой гидролиз ГТФ представляется необходимым для “энзиматического” (фактор-промотируемого) катализа нековалентных конформационных переходов в элонгационном цикле. Основная роль этого гидролиза — разрушение лиганда, обеспечивающего сродство катализатора к переходному конформационному состоянию, чтобы дать возможность выйти из этого промежуточного комплекса и перейти к следующему — продуктивному — состоянию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принципы структурной организации рибосомы, сформулированные в предыдущей статье [1], и в еще большей степени принципы функционирования, описанные здесь, отражают лишь сегодняшний уровень наших знаний и, естественно, не могут претендовать на полноту и достаточность для цельного понимания взаимосвязи между структурой и функцией. Тем не менее это первая попытка увязать структуру с функцией и представить не просто перечисление и описание различных структурных особенностей этой частицы и ее многочисленных функциональных проявлений, а обобщенную кон-

цептуальную картину. Кое-что здесь гипотетично. Многие потребуют дополнения в ближайшем будущем, а что-то и исправления. Но мне кажется, что как с научной, так и с образовательной точки зрения формулирование принципов, пусть неполное и предварительное, важнее и интереснее, чем просто систематизация фактов. Хочу заметить, что изложенные обобщения и идеи являются результатом моей работы в области исследования рибосом и регулярного обдумывания этих результатов на протяжении последних 35 лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Спирин А.С.* Принципы структуры рибосом // Соросовский Образовательный Журнал. 1998. № 11. С. 65–70.
2. *Спирин А.С.* Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986. 300 с.
3. *Спирин А.С.* О механизме работы рибосомы: Гипотеза смыкания–размыкания субчастиц // Докл. АН СССР. 1968. Т. 179. С. 1467–1470.
4. *Spirin A.S.* Energetics and Dynamics of the Protein-synthesizing Machinery // The Roots of Modern Biochemistry. B.; N.Y.: Walter de Gruyter and Co., 1988. P. 511–533.

* * *

Александр Сергеевич Спирин, доктор биологических наук, профессор и зав. кафедрой молекулярной биологии МГУ, директор Института белка РАН, действительный член РАН и член Президиума РАН, действительный член РАЕН, Российской академии биотехнологии и многих международных и зарубежных академий и организаций. Основной круг научных исследований — структура и функция белоксинтезирующего аппарата, регуляция биосинтеза белков, бесклеточные системы биосинтеза белков, котрансляционное сворачивание белков. Автор одного из томов (“Структура рибосомы и биосинтез белка”) трехтомного учебника для вузов “Молекулярная биология”, монографии “Рибосома” (два издания) на русском языке и трех монографий, изданных в США и Германии на английском языке, переведенных также на другие языки. Автор около 300 публикаций в российских и международных журналах.