



УДК 577.217.347,577.217.53

М. В. Родина

## МОДЕЛИ ЭЛОНГАЦИИ: ДВА ИЛИ ТРИ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ тРНК НА РИБОСОМЕ?

*Обсуждаются трехсайтовые модели цикла элонгации. Представлены противоречивые данные о существовании и свойствах третьего (Е) сайта на рибосомах, а также возможная функциональная роль Е-сайта. Кроме того, обсуждаются трехсайтовые модели, основывающиеся на различной ориентации тРНК на рибосоме в процессе элонгации. Делается вывод о необходимости расширения классической двухсайтовой модели Уотсона в соответствии с современными экспериментальными данными.*

Точное знание количества тРНК-связывающих участков на рибосоме представляет собой основу любого исследования ее функций. До недавнего времени описание элонгации базировалось на модели Уотсона [1]. Основными положениями модели являются: 1) существование по крайней мере двух физически и функционально различных сайтов связывания тРНК на рибосоме (А и Р); 2) концепция транслокации, т. е. движения синтезированной пептидил-тРНК из А- в Р-сайт, сопряженного с соответствующим смещением мРНК на один триплет. По двухсайтовой модели элонгации, две молекулы тРНК связаны с рибосомой в претранслокационном состоянии и одна — в пост-транслокационном. Транслокация сопряжена с выходом тРНК из рибосомы в раствор, причем деацилированная тРНК диссоциирует прямо из Р-сайта.

К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал, касающийся связывания тРНК с сайтами рибосомы и транслокации, который может быть интерпретирован в рамках двухсайтовой модели. В то же время получены результаты, противоречащие модели Уотсона. Так, Райнбергер и Ниерхаус [2] показали, что рибосомы из *Escherichia coli* могут связать одновременно три молекулы тРНК. Они предположили, что третий тРНК-связывающий участок должен выполнять функции выходного для деацилированной тРНК в процессе транслокации и выдвинули трехсайтовую модель элонгации, принципиально отличную от двухсайтовой модели [3]. Еще одна трехсайтовая модель элонгации, альтернативная как двухсайтовой модели Уотсона, так и трехсайтовой Ниерхауса, была предложена недавно в лаборатории Хардести [4]. В настоящем обзоре сделана попытка с учетом новых экспериментальных данных оценить необходимость замены традиционной двухсайтовой модели Уотсона одной из современных трехсайтовых моделей элонгации.

**Третий (Е) сайт на рибосомах: свойства.** В 1981—1983 гг. одновременно несколькими группами исследователей было показано, что 70S рибосомы из *E. coli* содержат третий, дополнительный, сайт связывания, специфический для деацилированной тРНК [3, 5—8]. Третий сайт связывания тРНК обнаружен и на эукариотических рибосомах [9, 10]. Оказалось, что он обладает иными свойствами, чем А- и Р-сайты: деацилированная тРНК быстро связывается с Е-сайтом и диссоциирует в раствор [5—8]; в случае же отщепления 3'-конца связывания не происходит [6]. Взаимодействие тРНК с Е-сайтом не ингибируется антибиотиками эдеином и тетрациклином [7]. Константа ассоциации тРНК с третьим сайтом сравнима или даже выше, чем с А-сайтом рибосомы [3, 7, 8, 11, 12], однако величина ее существенно отличается по данным разных авторов: Райнбергер и др. [3] сделали вывод о том, что деац-

лированная тРНК имеет приблизительно одинаковое сродство к Р- и Е-сайтам. Напротив, Кириллов и др. [11] показали, что константы ассоциации тРНК с Р- и Е-сайтами отличаются приблизительно на два порядка величины. К сходным выводам пришли также в работах [8, 12]. По-видимому [13], это расхождение является результатом неправильной интерпретации кривой Скэтчарда в работе [3].

Райнбергер и др. [2] наблюдали связывание трех молекул тРНК<sup>Phe</sup> на 70S рибосому в присутствии поли(U), но лишь одной молекулы тРНК<sup>Phe</sup> в отсутствие матрицы — на Р-сайте. Было показано [14], что тРНК<sup>Phe</sup>, связанная с Е-сайтом 70S рибосомы в присутствии поли(U), более эффективно обменивается на кодон-специфическую тРНК из раствора, чем на далекую по кодовому ответу тРНК<sup>Lys</sup>. Авторы заключили, что связывание тРНК с Е-сайтом полностью кодон-зависимо. Им было обнаружено, что транслирующая рибосома несет две молекулы тРНК в пре- и пост-транслокационном состояниях [15]. На основании этих данных Нерхаус и др. выдвигают гипотезу о том, что тРНК, находящаяся на А- и Р-сайтах рибосомы (пре-транслокационное состояние) или на Р- и Е-сайтах (пост-транслокационное состояние), взаимодействует с кодонами одновременно в обоих сайтах, чтобы не происходило «слипания» мРНК и ошибок, связанных со сдвигом рамки считывания [16].

Однако факт существования кодон-антикодового взаимодействия на Е-сайте не подтвержден в других лабораториях. Граевская и др. [5, 6] обнаружили связывание двух молекул тРНК с 70S рибосомой в отсутствие матрицы, по-видимому, с Р- и Е-сайтами. Отсутствие кодон-антикодового взаимодействия на Е-сайте показано еще двумя группами исследователей [7, 8, 11, 12, 17, 18]. Возможно, эффект кодон-зависимости связывания тРНК на Е-сайте, наблюдавшийся в работах Нерхауса, обусловлен неодинаковым сродством тРНК разной специфичности к Е-сайту, не связанным с кодон-антикодовым взаимодействием (меньшим «базальным» связыванием) [17-19]. Так, показано, что константы ингибирования связывания тРНК<sup>Phe</sup> с Е-сайтом 70S рибосомы в присутствии тРНК<sup>Lys</sup> одинаковы как при добавлении поли(U), так и без нее [19]. тРНК различной кодовой специфичности (тРНК<sup>Val</sup>, тРНК<sup>Arg</sup>, тРНК<sup>Met</sup>, тРНК<sup>Phe</sup>, тРНК<sup>Sec</sup>, тРНК<sup>Phe</sup> дрожжей, тРНК<sup>Phe</sup><sub>Wyc</sub>), способны связываться с Е-сайтом 70S рибосом в присутствии поли(U) и конкурировать с тРНК<sup>Phe</sup> за связывание с Е-сайтом, хотя и с разной эффективностью [17, 18]. тРНК<sup>Phe</sup><sub>Wyc</sub> (тРНК, лишенная У основания в антикодоне) была столь же эффективна в вытеснении меченой тРНК<sup>Phe</sup> из Е-сайта, что и тРНК<sup>Phe</sup>; это свидетельствует о том, что Е-сайт не способен отличать тРНК с модифицированной антикодовой петлей, в то время как Р-сайт в тех же условиях однозначно узнает эту модификацию [17]. В отличие от Р-сайта, антикодон тРНК на Е-сайте легко доступен для растворителя, что создает неоптимальные условия для кодон-антикодового взаимодействия [18]. Расстояние между антикодовыми петлями тРНК на Р- и Е-сайтах ( $3,4 \pm 0,8$  нм) больше такового между тРНК на А- и Р-сайтах ( $2,4 \pm 0,4$  нм). Существование кодон-антикодового комплекса на А- и Р-сайтах рибосомы можно считать доказанным. Поэтому тРНК на Е-сайте и физически не может находиться в контакте с мРНК [20].

Райнбергер и Нерхаус показали [15, 21], что деацилированная тРНК диссоциирует из Е-сайта при добавлении избытка аминоацил-тРНК к пост-транслокационному комплексу. Авторы предложили модель, согласно которой связывание тРНК с А-сайтом уменьшает сродство деацилированной тРНК к Е-сайту (принцип аллостерии) [3, 15, 22, 23]. Для проверки принципа аллостерии Робертсоном и Винтермайером [18] был проведен эксперимент, состоявший в параллельном тестировании связывания аналога пептидил-тРНК, AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup>, с рибосомой в присутствии поли(U) методом фильтрации через нитроцеллюлозные диски и диссоциации деацилированной тРНК из рибосомы в

результате транслокации методом флуоресцентной спектроскопии. Для этого на Р-сайт рибосомы предварительно связывали деацилированную тРНК<sup>Phe</sup>, а затем молекулу AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup> — на А-сайт; при этом Р- и А-сайты были количественно заполнены тРНК. Внесение фактора *EF-G* приводило к изменению флуоресцентных характеристик тРНК<sup>Phe</sup>, причем поляризация флуоресценции уменьшалась до уровня, характерного для Е-сайта, а количество молекул AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup>, связанных с рибосомой, не изменялось. Далее в реакционную смесь добавляли дополнительно AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup>. Происходило связывание второй молекулы AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup> — на освободившиеся А-сайты. Тем не менее флуоресцентные характеристики тРНК<sup>Phe</sup>, находящейся на Е-сайте, не изменялись. И лишь при добавлении восьмикратного избытка деацилированной тРНК<sup>Phe</sup> (не имеющей флуоресцентной метки) поляризация флуоресценции тРНК<sup>Phe</sup>, находящейся на Е-сайте, уменьшалась до уровня, характерного для тРНК в растворе, в результате обмена флуоресцентно меченой тРНК на немеченую тРНК из раствора. Аналогичные данные, свидетельствующие об отсутствии принципа аллостерии в связывании тРНК с А- и Е-сайтами, представлены также в работе [25]: в присутствии AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup> в Р-сайте и тРНК<sup>Phe</sup> в Е-сайте 70S рибосомы аминоацил-тРНК связывалась с А-сайтом в составе тройного комплекса (*EF-Tu*·GTP·Phe-тРНК<sup>Phe</sup>), а диссоциации деацилированной тРНК из Е-сайта не происходило.

Таким образом, функциональные свойства Е-сайта, описанного в работах лаборатории Нирхауса [2, 3, 15, 16, 21, 24], и Е-сайта, описанного другими исследователями [5—8, 11—13, 17—19], совершенно различны.

**Трехсайтовая модель элонгации Нирхауса.** На основании своих экспериментальных данных Нирхаусом была сформулирована трехсайтовая модель рибосомы [3], которая претендует на принципиальную новизну и является альтернативной по отношению к двухсайтовой модели Уотсона. Модель Нирхауса состоит в следующем:

1) рибосома содержит три сайта связывания тРНК. В ходе элонгации тРНК перемещается в направлении  $A \rightarrow P \rightarrow E$ ;

2) А- и Е-сайты аллостерически связаны отрицательной кооперативностью: заполнение одного сайта уменьшает сродство тРНК к другому и наоборот. Следовательно, рибосома может находиться в двух состояниях: в пре-транслокационном, когда тРНК имеет высокое сродство к А- и Р-сайтам, и пост-транслокационном, при котором отмечается высокое сродство тРНК к Р- и Е-сайту. Выход тРНК в раствор происходит не в результате транслокации, а при заполнении А-сайта;

3) обе тРНК на рибосоме одновременно взаимодействуют с кодонами на А- и Р- или Р- и Е-сайтах;

4) лишь одна молекула пептидил-тРНК может быть связана с рибосомой — либо с А-, либо с Р-сайтом (принцип исключения для связывания пептидил-тРНК);

5) обоим факторам элонгации может быть приписана одинаковая роль, а именно: уменьшение энергии активации перехода из одного состояния в другое: *EF-Tu* — из пост- в пре-транслокационное, *EF-G* — из пре- в пост-транслокационное.

Однако экспериментальные данные, приводимые в подтверждение модели, не согласуются с данными других групп исследователей. До сих пор причины противоречий между экспериментальными данными группы Нирхауса и других групп совершенно не ясны. Одно из возможных объяснений этих противоречий представлено в работах [25, 26]. Авторы работы [26] показывают, что деацилированная тРНК, вытесняемая из рибосомы в результате транслокации, вновь взаимодействует с рибосомой, но не с Е-, как предполагает Нирхаус, а с А-сайтом. Это взаимодействие обратно, зависит от концентрации  $Mg^{2+}$  и ингибируется тетрациклином, специфическим ингибитором А-сайта на 70S рибосомах. Способность деацилированной тРНК, диссоциировавшей с рибосомы в результате транслокации, повторно связываться с А-сайтом от-

мечалась также в [18]. Важно, что при создании различных функциональных комплексов на рибосоме Ниерхаус и др. предполагают, что относительное сродство деацилированной тРНК к сайтам рибосомы уменьшается в ряду  $P \rightarrow E \rightarrow A$ . Однако, как показано в работе [25], в экспериментальных условиях, использованных Ниерхаусом и др. (10 mM  $MgCl_2$  и 37 °C), связывание второй молекулы тРНК происходит не с E-, а с A-сайтом. Если E-сайт, обнаруживаемый Ниерхаусом, на самом деле является A-сайтом, то это позволяет объяснить результаты его экспериментов в рамках двухсайтовой модели. Так, аллостерическое влияние A- и E-сайтов в таком случае представляет собой конкуренцию комплекса (аминоацил-тРНК·EF-Tu·GTP) с деацилированной тРНК за связывание с A-сайтом; неудивительно в этом случае и то, что E-сайт Ниерхауса обладает матричной зависимостью.

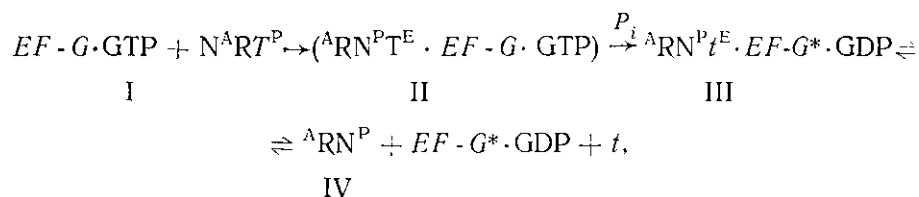
Еще одной причиной возникающих противоречий может быть неправильная оценка в работах лаборатории Ниерхауса доли активных рибосом [27]. Ниерхаус и др. считают, что использованные ими рибосомы были 100 %-но активны, однако основываются при этом на выдвинутом ими же «принципе исключения» для связывания пептидил-тРНК: если одна молекула  $AcPhe-tRНК^{Phe}$  может связаться на одну рибосому, то препарат рибосом считается активным на 100 % [23, 24]. В этом случае для деацилированной тРНК на рибосоме наблюдались три сайта связывания, для аминоацил-тРНК — два, но только в присутствии фактора элонгации EF-Tu и лишь 15 % (!) рибосом были компетентны в реакции транспептидации [23]. Необходимо отметить, что связывание двух молекул пептидил-тРНК на рибосому наблюдалось неоднократно [6, 8, 12, 27—29], поэтому «принцип исключения» для связывания пептидил-тРНК никак не может быть критерием для оценки активности рибосом.

Таким образом, данные работ Ниерхауса и др. не согласуются с результатами других исследователей и, хотя причины этих противоречий на сегодняшний день не выяснены, трехсайтовая модель элонгации Ниерхауса не может считаться серьезно обоснованной.

Тем не менее само наличие третьего сайта связывания тРНК на рибосомах подтверждено [5—10]; очевидно, что для включения его в модель элонгации необходимо изучение функциональной роли E-сайта на рибосоме.

**Третий (E) сайт на рибосомах: функция.** Еще Веттштейном и Нолем [9, 30] было высказано предположение, что E-сайт является выходным для тРНК. Действительно, имеющиеся данные о свойствах E-сайта согласуются с этой гипотезой, а именно: 1) E-сайт заполняется незадолго либо одновременно с перемещением пептидил-тРНК в результате транслокации [31]; 2) он примыкает к P-сайту, поскольку возможен эффективный перенос энергии флюоресценции между молекулами тРНК, находящимися в P- и E-сайтах [20]; 3) E-сайт специфичен именно для деацилированной тРНК [2, 3, 5—10] и 4) имеет довольно высокое сродство к тРНК в различных ионных условиях [7, 8, 12, 19]; 5) скорее всего, E-сайт является кодон-независимым [5—8, 11, 12, 17—19]; 6) связывание тРНК с E-сайтом термодинамически стабильно, но кинетически лабильно [5—8]. По-видимому, именно из-за того, что тРНК способна быстро диссоциировать из E-сайта в раствор, третий сайт связывания на рибосомах не был обнаружен в работах [32—36], где использовали методы фильтрации через питроцеллюлозные мембраны, центрифугирования или хроматографии, связанные с увеличением объема проб или промывки. Предполагается, что E-сайт может конкурировать с P-сайтом за связывание с тРНК за счет довольно высокого сродства тРНК к E-сайту, однако выход из E-сайта в раствор кинетически предпочтительнее, чем из P-сайта. Более того, если конформация тРНК на рибосоме отличается от таковой в растворе, E-сайт может быть именно тем участком, на котором происходит переход из одной конформации в другую. Таким образом, предполагается, что комплекс тРНК с E-сайтом является промежуточным этапом на пути выхо-

да тРНК из рибосомы в раствор. Робертсон и др. [37] предложили следующую схему участия Е-сайта в транслокации:



где  $A R^{PE}$  — рибосома, имеющая А-, Р- и Е-сайты; N — пептидил-тРНК; T и t — деацелированная тРНК, находящаяся в различной конформации; T — прочно связанная с рибосомой, t — благоприятная для ухода тРНК в раствор; EF-G и EF-G\* — различные конформации фактора элонгации — GTP- и GDP-связывающие формы соответственно.

После связывания EF-G · GTP с пре-транслокационным комплексом (I) происходит транслокация и образуется промежуточный комплекс (II), содержащий GTP-связывающую форму EF-G, в котором происходит гидролиз GTP и переход EF-G в GDP-связывающую форму (III). В таком комплексе Е-сайтовое состояние тРНК уже другое, чем в комплексе II, имеющее меньшее число тРНК-рибосомных контактов (t). Авторы предполагают, что изменение состояния тРНК на Е-сайте сопряжено с гидролизом GTP. Транслокация, судя по данным работы [20], состоит по крайней мере из трех этапов; при добавлении к пре-транслокационному комплексу EF-G и GTP происходит одновременное перемещение двух тРНК из А- в Р-сайт и из Р в Е без изменения расстояния между ними. Поскольку показано, что расстояние между Р- и Е-сайтами (~3,4 нм) в условиях стационарной кинетики больше, чем между А- и Р-сайтами (~2,4 нм), очевидно, что после быстрого этапа транслокации деацелированная тРНК еще не находится на Е-сайте, а попадет туда в результате второго этапа. Тогда, по-видимому, и происходит разрыв кодон-антикодового взаимодействия между деацелированной тРНК и мРНК. Амплитуда релаксации на втором этапе существенно уменьшается при увеличении концентрации ионов  $Mg^{2+}$ . Чрезвычайно сходная зависимость от  $Mg^{2+}$  обнаружена для процесса диссоциации тРНК из рибосомы: при повышенных концентрациях  $Mg^{2+}$  меньшее количество тРНК диссоциирует из Е-сайта [18]. Поэтому, по-видимому, промежуточный этап транслокации соответствует именно высвобождению молекулы тРНК. Наконец третий, медленный этап транслокации, очевидно, представляет собой медленное конформационное изменение обеих молекул тРНК и/или рибосомы, поскольку наблюдается изменение не только эффективности синглет-синглетного переноса энергии флюоресценции, но и эмиссии каждого из флюорофоров. Показано, что на первом этапе не происходит диссоциации тРНК из рибосомы, т. е. реакции перемещения тРНК из А- в Р-сайт и выхода тРНК из Е-сайта в раствор не сопряжены.

Известно, что для перемещения комплекса пептидил-тРНК · мРНК при транслокации не нужен гидролиз GTP. Например, медленный синтез полифенилаланина может происходить и в отсутствие EF-G [38]. EF-G в присутствии нерасщепляемых аналогов GTP, гуанилил-метилендифосфоната [32] или гуанилил-иминодифосфоната [39], стимулирует реакцию пептидил-тРНК с пурамином, если пептидил-тРНК была предварительно связана с А-сайтом пре-транслокационного комплекса, хотя эффективность транслокации и ее скорость при этом понижены [38]. В работе [37] показано, что при заполнении А-сайта аминоацил-или пептидил-тРНК (образование пре-транслокационного комплекса) осуществляется медленный гидролиз GTP. Скорость его лимитируется медленным перемещением тРНК из А- в Р-сайт, после которого GTP быстро гидролизуются. Поскольку гидролиз GTP происходит в ходе транслокации вслед за перемещением пептидил-тРНК из А- в Р-сайт, часть энергии гидролиза могла бы расходоваться на выброс тРНК из

Е-сайта. В работе [18] показано, что при замене GTP на его негидролизуемые аналоги происходит следующее: 1) кинетика транслокации из А- в Р-сайт не меняется; 2) кинетика выхода деацилированной тРНК из Р-сайта также не изменяется; 3) не изменяется и скорость обмена тРНК, связанной с рибосомой, на тРНК из раствора; 4) существенно замедляется этап, следующий за вытеснением тРНК из Р- в Е-сайт, по до диссоциации тРНК в раствор. Более того, это изменение не связано с ингибированием диссоциации *EF-G* из пост-транслокационного комплекса, поскольку кинетики диссоциации тРНК из Е-сайта идентичны в присутствии или в отсутствие фузидовой кислоты, ингибитора диссоциации *EF-G* из рибосомы. В присутствии одновременно *EF-G*, негидролизуемого аналога GTP и тРНК<sup>Phe</sup>, выход тРНК из Р- в Е-сайт оказался чрезвычайно медленным. Приведенные данные позволяют предположить, что эффективный выход тРНК из Е-сайта требует гидролиза GTP.

В отсутствие гидролиза GTP тРНК может переходить в состояние III (см. схему) очень медленно. Наконец, комплекс III диссоциирует с образованием пост-транслокационного комплекса IV, способного участвовать в следующем раунде элонгации.

Молекулярной основой различий в комплексах II и III может быть изменение конформации тРНК, находящейся в Р-сайте (более развернутая конформация [40—42]), до конформации, характерной для тРНК в растворе (более компактная конформация). Предполагается, что у тРНК, находящейся в более развернутой конформации, сродство к рибосоме выше, чем у тРНК в более компактной конформации; изменение конформации тРНК и является функцией Е-сайта и сопряжено с гидролизом GTP, а сам по себе Е-сайт можно представить как совокупность состояний тРНК при выходе ее из рибосомы [18, 37].

Необходимо отметить, что трехсайтовая модель элонгации, предлагаемая в работах [13, 18, 37], принципиально не противоречит модели Уотсона и концепции транслокации, сформулированной на ее основе, а лишь расширяет и конкретизирует механизмы процесса элонгации.

**Трехсайтовая модель элонгации Хардести.** Совершенно оригинальная трехсайтовая модель была предложена недавно Хардести и др. [4]. Она основана на следующем. В экспериментах по изучению переноса энергии от флуоресцентных меток на тРНК<sup>Phe</sup> или AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup> к меткам, пришитым к белкам *S21* и *L11*, или другим тРНК показано [4], что деацилированная тРНК, образовавшаяся на Р-сайте в результате транспептидации или связавшаяся с Р-сайтом из раствора, отличается ориентацией по отношению к белкам *S21* и *L11* от AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup>, связанной с Р-сайтом. Перемещение тРНК из положения, характерного для AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup>, в положение, характерное для деацилированной тРНК, не связано с фактор-зависимым гидролизом GTP, но строго коррелирует с реакцией транспептидации. Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, связанная с рибосомой в составе тройного комплекса с *EF-Tu*·GTP, занимает в рибосоме приблизительно то же положение, что и AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup>, связанная неэлизматически. Реакция транспептидации приводит также к изменению конформации самой тРНК в области *D*-петли и *U47* [43]. Авторы считают, что эти данные противоречат классической двухсайтовой модели. В соответствии с моделью Уотсона, синтезирующийся пептид физически переносится с пептидил-тРНК, находящейся в Р-сайте, на аминокислоту следующей аминоацил-тРНК, связавшейся с А-сайтом; эта модель предсказывает, что пептидил- и деацилированная тРНК, образовавшаяся в результате реакции транспептидации, функционально находятся на Р-сайте в одинаковом рибосомном окружении. На основе экспериментальных данных, представленных в работах [4, 43], а также данных о существовании пре-А-сайта [44—47], Хардести и др. выделили три сайта связывания тРНК на рибосоме: 1) пре-А-сайт: связывание аминоацил-тРНК в составе тройного комплекса (*EF-Tu*·GTP·аминоацил-тРНК) до гидролиза GTP (entry site); 2) пептидил-трансфераз-

ный центр: положение пептидил-тРНК в рибосоме (или аминоксил-тРНК после гидролиза GTP); 3) выходной сайт: положение деацилированной тРНК после реакции транспептидации (exit site).

Основной идеей модели Хардести является то, что синтезирующийся пептид находится в фиксированном положении относительно рибосомы. Следующая аминоксил-тРНК вытесняет тРНК из пептидил-тРНК, а транслокация представляет собой только движение тРНК, а не движение пептидного остатка. В результате пептидил-трансферазной реакции изменяется конформация тРНК. Авторы работ [4, 43] считают, что конформационные изменения тРНК могут играть весьма важную роль в движении тРНК и мРНК по рибосоме в процессе биосинтеза белка.

Модель не отвергает возможности одновременного связывания трех молекул тРНК на рибосоме, однако и не подтверждает трехсайтовую модель элонгации Ньерхауса [3]. Очевидно, что для подтверждения описанной модели требуются серьезные экспериментальные данные. В то же время подход к выделению сайтов на рибосоме, основанный на изменении конформации и/или ориентации тРНК на рибосоме, является весьма спорным. Так, выделенный Хардести и др. в самостоятельном сайте пре-А-участок не является независимым, а представляет собой часть А-сайта [46]. Сайт, названный в работе [4] пептидил-трансферазным центром, включает в себя канонические А- и Р-сайты, различающиеся между собой как физически, так и функционально. С другой стороны, показано, что окружение тРНК зависит не только от локализации тРНК (А-, Р- или Е-сайт), но и от конкретного функционального состояния тРНК (аминоксил-тРНК, пептидил-тРНК, деацилированная тРНК, до или после реакции транспептидации, до или после реакции транслокации) [48—51]. Так, используя в качестве критерия выделения сайта на рибосоме изменение локального окружения тРНК, имеющее определенный функциональный смысл, можно, основываясь, например, на результатах работы [50], выделить шесть (!) сайтов связывания тРНК на рибосоме. Все сказанное выше лишнее раз подчеркивает, что дискуссия об определении понятия «сайт связывания тРНК на рибосоме» [52—55] является актуальной до сих пор.

**Заключение.** В настоящее время становится все более очевидным, что элонгация — чрезвычайно сложный процесс, в котором происходят динамические изменения и рибосомы, и связывающихся с ней лигандов. Показано, что отдельные стадии цикла элонгации (связывание аминоксил-тРНК и транслокация) представляют собой многоступенчатые процессы [20, 31, 45, 46, 56]. Ориентация лигандов и структура А- и Р-сайтов также изменяются в процессе элонгации [4, 43, 48—51]. Тем не менее большинство экспериментальных данных, полученных к настоящему времени, по-видимому, могут быть интерпретированы в рамках трехсайтовой модели [13, 18, 37], являющейся расширенным и детализированным вариантом модели Уотсона. Основной чертой этой модели является наличие на рибосоме, кроме канонических А- и Р-сайтов, третьего сайта, Е. В процессе элонгации тРНК перемещается в направлении  $A \rightarrow P \rightarrow E$  с разрывом кодоп-антикодонового взаимодействия при переходе тРНК из Р- в Е-сайт и повышением свободной энергии тРНК на 4—5 ккал/моль [57]. Возможно, что для перемещения деацилированной тРНК из Р- в Е-сайт необходим *EF-G*-зависимый гидролиз GTP [37].

К сожалению, необходимо отметить, что все работы, посвященные изучению Е-сайта, выполнены в модельных системах связывания тРНК с рибосомами на единственной тРНК — фенилаланиновой и матрице поли(U); условия в такой системе чрезвычайно далеки не только от таковых в клетке, но даже и от условий бесклеточных систем трансляции, причем наиболее существенными различиями являются, во-первых, низкая скорость транслокации в такой модельной системе, не соответствующая общей скорости элонгации бесклеточных белоксинтезирующих систем [58], и, во-вторых, отсутствие некоторых компонентов аппарата трансляции, например, аминоксил-тРНК синтетаз, которые также могут

влиять на процесс элонгации [18]. Поэтому основной вопрос, не решенный к настоящему времени, заключается в следующем: реализуется ли E-сайт *in vivo*? По-видимому, только решение этого вопроса является решающим аргументом в пользу одной из моделей элонгации и позволит существенно расширить наше понимание процесса биосинтеза белка на рибосоме.

Автор выражает благодарность А. В. Ельской за идею написания обзора, обсуждение материала и ценные замечания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watson J. D. The synthesis of protein upon ribosomes // Bull. Soc. Chim. Biol.—1964.—46, N 12.— P. 1399—1425.
2. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. Simultaneous binding of three tRNA molecules by the ribosome of *Escherichia coli* // Biochem. Int.—1980.—1, N 4.— P. 297—303.
3. Rheinberger H.-J., Sternbach H., Nierhaus K. H. Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 9.— P. 5310—5314.
4. Hardesty B., Odom O. W., Deng H. Y. Movement of tRNA through ribosomes during peptide elongation: the displacement reaction model // Structure, function and genetics of ribosomes / Eds B. Hardesty, G. Kramer.—New York: Springer, 1986.— P. 495—508.
5. Саминский Е. М., Граевская Р. А., Иванов Ю. В. 70S рибосомы связывают деацилированную тРНК на участке, не совпадающем с А и Р сайтами // Реализация наследственной информации: Тез. Всесоюз. симпозиум.—Паланга, 1980.— С. 92.
6. Grajevskaja R. A., Ivanov Yu. V., Saminsky E. M. 70S ribosomes of *Escherichia coli* have an additional site for deacylated tRNA binding // Eur. J. Biochem.—1982.—128, N 1.— P. 47—52.
7. Kirillov S. V., Makarov E. M., Semenov Yu. P. Quantitative study of interaction of deacylated tRNA with *Escherichia coli* ribosomes. Role of 50S subunits in formation of the E site // FEBS Lett.—1983.—157, N 1.— P. 91—94.
8. Lill F., Robertson J. M., Wintermeyer W. tRNA binding sites of ribosomes from *Escherichia coli* // Biochemistry.—1984.—23, N 26.— P. 6710—6717.
9. Wettstein F. O., Noll H. Binding of transfer ribonucleic acid to ribosomes engaged in protein biosynthesis: number and properties of ribosomal binding sites // J. Mol. Biol.—1965.—11, N 1.— P. 35—53.
10. Number of tRNA binding sites on 80S ribosomes and their subunits / M. V. Rodina, A. V. El'skaya, Yu. P. Semenov, S. V. Kirillov // FEBS Lett.—1988.—231, N 1.— P. 71—74.
11. Семенов Ю. П., Макаров Е. М., Кириллов С. В. Количественное изучение взаимодействия деацилированной тРНК с Р-, А- и Е-сайтами 70S рибосомы *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 4.— С. 183—194.
12. Lill R., Robertson J. M., Wintermeyer W. Affinities of tRNA binding sites of ribosomes from *Escherichia coli* // Biochemistry.—1986.—25, N 11.— P. 3245—3255.
13. Kirillov S. V., Semenov Yu. P. Extension of Watson's model for the elongation cycle of protein biosynthesis // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1986.—4, N 12.— P. 263—269.
14. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. Codon-anticodon interaction at the ribosomal E site // J. Biol. Chem.—1986.—261, N 20.— P. 9140—9143.
15. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. Testing an alternative model for the ribosomal elongation cycle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 14.— P. 4213—4217.
16. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. Adjacent codon-anticodon interaction of both tRNAs present at the ribosomal A and P sites or P and E sites // FEBS Lett.—1986.—204, N 1.— P. 97—99.
17. Lill R., Wintermeyer W. Destabilization of codon-anticodon interaction in the ribosomal exit site // J. Mol. Biol.—1987.—196, N 1.— P. 137—148.
18. Robertson J. M., Wintermeyer W. Mechanism of ribosomal translocation. tRNA binds transiently to an exit site before leaving the ribosome during translocation // *Ibid.*— N 4.— P. 525—540.
19. Макаров Е. М. Взаимодействие деацилированной тРНК с рибосомами *E. coli*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Л., 1986.—24 с.
20. Paulsen H., Wintermeyer W. tRNA topography during translocation. Steady-state and kinetic fluorescence energy-transfer studies // Biochemistry.—1986.—25, N 10.— P. 2749—2756.
21. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. Allosteric interaction between the ribosomal transfer RNA binding sites A and E // J. Biol. Chem.—1986.—261, N 20.— P. 9133—9139.
22. Nierhaus K. H. New aspects of ribosomal elongation cycle // Mol. and Cell. Biochem.—1984.—64, N 1.— P. 63—81.
23. Saruyama H., Nierhaus K. H. Evidence that the three-site model for the ribosomal elongation cycle is also valid in the *Archaeobacterium Halobacterium halobium* // Mol. and Gen. Genet.—1986.—204, N 2.— P. 221—228.
24. Rheinberger H.-J., Schilling S., Nierhaus K. H. The ribosomal elongation cycle: tRNA binding translocation and tRNA release // Eur. J. Biochem.—1983.—134, N 3.— P. 421—428.



25. Дорохов Д. Б., Одинцов В. Б., Кириллов С. В. Связывание аминоацил-тРНК с А-участком не вызывает удаления деацилированной тРНК из Е-участка 70S рибосомы // Биополимеры и клетка.— 1989.—5, № 1.— С. 32—35.
26. Baranov V. I., Ryabova L. A. Is the three-site model for the ribosomal elongation cycle sound? // Biochimie.— 1988.—70, N 2.— P. 259—265.
27. Kirillov S. V., Semenov Yu. P. Non-exclusion principle of AcPhe-tRNA interaction with the donor and acceptor sites of *Escherichia coli* ribosomes // FEBS Lett.— 1982.—148, N 2.— P. 235—238.
28. Odintsov V. B., Kirillov S. V. Interaction of N-acetyl-phenyl-alanyl-tRNA with 70S ribosomes of *Escherichia coli* // Nucl. Acids Res.— 1978.—5, N 10.— P. 3871—3879.
29. Binding of tRNA in different functional states to *Escherichia coli* ribosomes as measured by velocity sedimentation / M. Schmitt, U. Neugebauer, C. Bergemann et al. // Eur. J. Biochem.— 1982.—127, N 3.— P. 525—529.
30. Voll H. Chain initiation and control of protein synthesis // Science.— 1966.—151, N 3715.— P. 1241—1245.
31. Robertson J. M., Paulsen H., Wintermeyer W. Pre-steady-state kinetics of ribosomal translocation // J. Mol. Biol.— 1986.—192, N 2.— P. 351—360.
32. Inoue-Yokosawa N., Ishikawa C., Kaziro Y. The role of GTP in translocation reaction catalysed by elongation factor G // J. Biol. Chem.— 1974.—249, N 14.— P. 4321—4323.
33. Masumi M., Tanaka N. Mechanism of inhibition of translocation by kanamycin and viomycin: a comparative study with fusidic acid // Biochim. et biophys. acta.— 1980.—92, N 3.— P. 647—654.
34. Spirin A. S. Testing of the classical two-tRNA site model for the elongation ribosomal peptide elongation cycle // FEBS Lett.— 1984.—165, N 2.— P. 280—284.
35. Ishitsuka H., Kuriki Y., Kaji A. Release of transfer ribonucleic acid from ribosomes. A factor G-dependent and guanosine triphosphate-dependent reaction // J. Biol. Chem.— 1970.—245, N 13.— P. 3346—3351.
36. Lucas-Lenard J., Haenni A.-L. Release of transfer RNA during peptide chain elongation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1969.—63, N 1.— P. 93—97.
37. Mechanism of ribosomal translocation. Translocation limits the rate of *Escherichia coli* elongation factor G-promoted GTP hydrolysis / J. M. Robertson, C. Urbanke, C. Chinali et al. // J. Mol. Biol.— 1986.—189, N 4.— P. 653—662.
38. Factor-free (non-enzymic) and factor-dependent systems of translocation of polyuridylic acid / L. P. Gavrilova, O. E. Kostyashkina, V. E. Koteliansky et al. // Ibid.— 1976.—101, N 4.— P. 537—552.
39. Modollel J., Girbes T., Vazquez D. Ribosomal translocation promoted by guanylylimidodiphosphate and guanylylmethylene diphosphate // FEBS Lett.— 1975.—60, N 1.— P. 109—113.
40. Robertson J. M., Wintermeyer W. Effect of translocation on topology and conformation of anticodon and D loops of tRNA<sup>Phe</sup> // J. Mol. Biol.— 1981.—151, N 1.— P. 57—79.
41. Farber N., Cantor C. R. Comparison of the structure of free and ribosome bound tRNA<sup>Phe</sup> by using slow tritium exchange // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1980.—77, N 7.— P. 5135—5139.
42. Peattie D. A., Herr W. Chemical probing of tRNA-ribosome complex // Ibid.— 1981.—78, N 4.— P. 2273—2277.
43. Odom O. W., Hardesty B. An apparent conformational change in tRNA<sup>Phe</sup> that is associated with the peptidyl transferase reaction // Biochimie.— 1987.—69, N 9.— P. 926—938.
44. Skogerson L., Moldave K. Evidence for aminoacyl-tRNA binding peptide bond synthesis and translocase activities in aminoacyl transferase reaction // Arch. Biochem. and Biophys.— 1968.—125, N 3.— P. 497—505.
45. Hardesty B., Culp W., McKeehan E. The sequence of reaction leading to the synthesis of a peptide bond on reticulocyte ribosomes // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1969.—39.— P. 331—334.
46. Lake J. A. Aminoacyl-tRNA binding at the recognition site in the first step of the elongation cycle of protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.—74, N 5.— P. 1903—1907.
47. Haenni A.-L., Lucas-Lenard J. Stepwise synthesis of a tripeptide // Ibid.— 1968.—61, N 3.— P. 1363—1369.
48. The effect of aminoacyl or peptidyl-tRNA at the A-site on the arrangement of deacylated tRNA at the P site / G. T. Babkina, E. V. Bousk, D. M. Graifer et al. // FEBS Lett.— 1984.—170, N 2.— P. 290—294.
49. The effect of GTP hydrolysis and transpeptidation on the arrangement of aminoacyl-tRNA at the A-site of *Escherichia coli* 70S ribosome / S. N. Vladimirov, D. M. Graifer, G. G. Karova et al. // Ibid.— 1985.—181, N 2.— P. 367—372.
50. Фотоаффинная модификация Е сайта рибосом *Escherichia coli* / С. Н. Владимиров, Д. М. Грайфер, М. А. Зенкова и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.—5, № 1.— С. 35—40.
51. Polynucleotide-protein interaction in the translation system. Identification of proteins interacting with tRNA in the A and P sites of *Escherichia coli* ribosomes / G. G. Abdurashidova, M. F. Turchinsky, Kh. A. Aslanov, E. I. Budovsky // Nucl. Acids Res.— 1979.—6, N 10.— P. 3891—3909.
52. Prince J. B., Garrett R. A. tRNA binding to ribosomes two sites or more? // Trends Biochem. Sci.— 1982.—7, N 3.— P. 79.

53. Nierhaus K. H., Rheinberger H. J. Transfer RNA binding to ribosomes—2 sites or more // *Ibid.*— N 8.— P. 280.
54. Prince J. B., Garrett R. A. Transfer RNA binding to ribosomes—2 sites or more? // *Ibid.*
55. Кириллов С. В., Семенов Ю. П. Взаимодействие тРНК с рибосомами. Молекуляр. биология.— 1984.—18, № 5.— С. 1249—1263.
56. Wintermeyer W., Robertson J. M. Transient kinetics of transfer ribonucleic acid binding to the ribosomal A and P sites: observation of a common intermediate complex // *Biochemistry.*— 1982.—21, N 9.— P. 2246—2252.
57. Кириллов С. В. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах // Итоги науки и техники.— М.: ВПНИТИ, 1983.— С. 5—98. (Сер. Биол. науки, Т. 18).
58. Mechanism of ribosomal translocation / W. Wintermeyer, R. Lill, H. Paulsen, J. M. Robertson // Structure, function and genetics of ribosomes / Eds B. Hardesty, C. F.allermer.— New York: Springer, 1986.— P. 523—540.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получен: 17.02.89

#### MODELS OF ELONGATION:

#### TWO OR THREE tRNA BINDING SITES ON THE RIBOSOME?

M. V. Rodnina

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR

#### Summary

Three-site models of the ribosomal elongation cycle are discussed. The controversial experimental data on the interaction between tRNA and the third ribosomal site (E) are presented. The functional role of the E site in the translocation process is considered. The alternative three-site model based on different tRNA orientation during the elongation cycle on the ribosome is discussed. It is concluded that the classical two-site model is to be extended on the basis of the recent experimental data.

УДК 575.113+577.21

**Г. З. Ермак, П. А. Каргель**

### ПРОСТЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК В ГЕНОМАХ ЭУКАРИОТ

*Кратко рассмотрены распространение простых последовательностей ДНК в геномах различных организмов, их локализация, возможные функции, происхождение и эволюция. Обсуждена возможность участия этих последовательностей в регуляции работы генов и рекомбинациях.*

Геномы различных организмов (особенно эукариот), кроме последовательностей ДНК, кодирующих белки, содержат ряд других, в том числе и так называемые простые последовательности. К ним относят последовательности ДНК, состоящие из tandemно повторяющихся нескольких или одного нуклеотида. Например, простой можно назвать гетерополимерную чередующуюся последовательность поли(dA—dT) · поли(dT) × × (dA) или гомополимер поли(dA) · поли(dT) (для краткости в дальнейшем будем обозначать их АТ и А соответственно). Четких представлений о структуре и функции простых последовательностей пока нет, так как исследуются они сравнительно недавно. Длина этих последовательностей может быть сколь угодно большой, но, как правило, она не превышает 100 нуклеотидов. Нижняя граница длины также довольно условна и чем меньше ее принять, тем чаще такая последовательность будет представлена в различных геномах. Последовательности длиной до 10 нуклеотидов — явление вполне обычное в различных геномах, длиной 14 нуклеотидов и более встречаются гораздо реже, а у зубактерий они вообще не детектированы [1]. Возможно, это и есть нижняя