

УДК 577.052.2

ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ЭЛОНГАЦИИ

Обзор

© 2020 Е.В. Полесскова, М.Ю. Каюмов, С.В. Кириллов, А.Л. Коневега*

*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300 Гатчина,
Ленинградская обл., Россия; электронная почта: konevega_al@pnpi.nrcki.ru*

Поступила в редакцию 05.07.2020

После доработки 01.08.2020

Принята к публикации 01.08.2020

Трансляционные ГТФазы (трГТФазы), относящиеся к классу G-белков, играют ключевую роль на всех этапах биосинтеза белка на рибосоме. Однонаправленность и цикличность функционирования G-белков обеспечивается возможностью их переключения между активным и неактивным состояниями вследствие гидролиза ГТФ, ускоряемого вспомогательными белками-стимуляторами ГТФазной активности. Несмотря на то что трГТФазы взаимодействуют с рибосомами, находящимися в разных конформационных состояниях, для активации они связываются с одной и той же консервативной областью, которая, в отличие от классических белков-стимуляторов ГТФазной активности, представлена РНК. В результате у всех факторов элонгации образуется практически одинаковая структура активного каталитического центра, предполагающая единый механизм реакции гидролиза ГТФ. Однако нюансы в процессе формирования активированного состояния, а также существенно отличающаяся скорость реакции гидролиза ГТФ указывают на существование особенностей при реализации гидролитической функции разными факторами элонгации. В данной работе представлено современное видение механизмов регулирования ГТФазной активности факторов элонгации EF-Tu, EF-G и SelB и гидролиза ГТФ, основанное на анализе структурных, биохимических и биоинформатических данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: факторы элонгации, трансляция, гидролиз ГТФ, EF-Tu, EF-G, SelB, рибосома.

DOI: 10.31857/S032097252011010X

ВВЕДЕНИЕ

Гидролиз ГТФ является ключевой реакцией на всех этапах биосинтеза белка [1, 2]. На рибосоме эта реакция катализируется филогенетически связанными белковыми факторами, трансляционными ГТФазами (трГТФазами), представителями семейства которых являются бактериальные факторы EF-Tu, EF-G, IF2, RF3, LcpA, SelB и их гомологи у архей и эукариот, а также некоторые другие белки [3]. Это семейство, в свою очередь, входит в состав суперсемейства ГТФ-гидролизующих белков или G-белков, являющихся регуляторными молекулярными переключателями, которые циркулируют между активным ГТФ-связанным и неак-

тивным ГТФ-связанным состояниями [4–6]. Переходы между этими двумя конформациями регулируются гидролизом ГТФ, который в ряде случаев может ускоряться с помощью вспомогательных белков, стимулирующих ГТФазную активность G-белков [5, 6].

Несмотря на различия в аминокислотной последовательности, структура Ras-подобного нуклеотид-связывающего G-домена схожа у всех ГТФаз. В его состав входят пять консервативных областей, которые обеспечивают взаимодействие с гуаниновым нуклеотидом [7, 8]. G1 область – фосфат-связывающая петля (P-петля) – связывает α - и β -фосфаты гуанинового нуклеотида. G2 и G3 области – регионы switch I и switch II – взаимодействуют с γ -фосфатом, белками-стимуляторами ГТФазной активности и претерпевают значительные конформационные изменения при гидролизе ГТФ [9]. G4 и G5 отвечают за связывание гуанинового основания, обеспечивая субстратную специфичность.

Многолетние биохимические, генетические и структурные исследования позволили иденти-

Принятые сокращения: трГТФазы – трансляционные ГТФазы; СРП – сарцин-рициновая петля; GTP γ S – гуанозин-5'-О-[γ -тио]трифосфат; PDB – Protein Data Bank; ID – идентификационный код; Sec – селеноцистеин, 21-я протеиногенная аминокислота; SECIS – Sec Insertion Sequence; aa-тРНК – аминоацил-тРНК.

* Адресат для корреспонденции.

фицировать ключевые элементы, входящие в состав каталитического центра трГТФаз. На конце региона switch II после глицинового остатка консервативного мотива DXXG находится остаток инвариантного для трГТФаз гистидина – His84 (нумерация а.о. трГТФаз здесь и далее по тексту приводится в соответствии с последовательностью EF-Tu из *Escherichia coli*, если не указано иное) [4, 10]. Замена этого остатка гистидина в факторах элонгации EF-Tu и EF-G на другие а.о. приводит к ингибированию стимулированной рибосомой реакции гидролиза ГТФ [11–16]. В структурных работах, визуализирующих рибосомные комплексы, содержащие элонгационные факторы EF-Tu, EF-G и SelB в активированном состоянии, остатки гистидина обнаруживаются в схожих конформациях, направленных на γ -фосфат ГТФ через так называемые «гидрофобные ворота» [17–23]. Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа комплекса EF-Tu с аналогом ГТФ β - γ -метилenguанозин-5'-трифосфатом (GDPCP) и рибосомой, было предложено, что His84 действует как каталитический остаток, который депротонирует молекулу воды для атаки на связь между β - и γ -фосфатами ГТФ [17]. Были также представлены и альтернативные механизмы, в которых His84 играет стабилизирующую роль для воды, выступающей в роли нуклеофила [24, 25]. Дополнительная координация этой молекулы воды осуществляется за счёт водородных связей с остатками Thr61 из региона switch I и глицина Gly83 из региона switch II, находящихся в непосредственной близости от γ -фосфата ГТФ (рис. 1) [17, 20, 26]. Помимо регионов switch I и switch II в позиционировании гуанинового нуклеотида внутри фактора участвуют а.о. Р-петли. К ним относится остаток аспарагиновой кислоты Asp21 и универсально консервативная последовательность GKT, существующая не только в трГТФазах, но и во всех G-белках [27]. Asp21 занимает крайне важное положение – он координирует вторую молекулу воды над γ -фосфатом ГТФ в EF-G [19] и образует водородные связи с кислородом, расположенным между β - и γ -фосфатами в EF-Tu [17] и немостиковыми кислородами этих фосфатов в SelB [20]. Атомы кислорода β - и γ -фосфатов дополнительно координируются ионом Mg^{2+} , который, по-видимому, также помогает ГТФ принять правильную конформацию для осуществления гидролиза [17]. Ещё один ион Mg^{2+} находится в положении, связывающем Asp Р-петли и остаток A2662 консервативной области большой субъединицы рибосомы сарцин-рициновой петли (СРП) в ассоциированных с рибосомой комплексах SelB и EF-G [19, 20]. С остатками именно этой области

рибосомы взаимодействует и инвариантный His84, предположительно выполняющий каталитическую роль [17, 22]. Анализ структурных и биохимических данных показал, что СРП выступает не только в роли платформы для эффективного связывания трГТФаз с рибосомой [28, 29], но и участвует в регулировании их ГТФазной активности [28, 30, 31]. Это позволяет предположить, что, в отличие от множества G-белков, для запуска эффективного гидролиза ГТФ которых необходимы белки, стимулирующие их ГТФазную активность [7, 8], трГТФазы взаимодействуют с РНК рибосомы, обеспечивающей катализ или конформационные перегруппировки трГТФаз, необходимые для реакции гидролиза ГТФ [30, 31].

Анализ структурных данных выявил, что консервативный остаток гистидина взаимодействует с кислородом фосфатной группы A2662 не только в случае EF-Tu [17, 22, 32], но и в факторе EF-G [19, 26, 33]. В результате появилась гипотеза об универсальном механизме, при реализации которого A2662 СРП переориентирует остаток His84 по сравнению с его положением в не связанном с рибосомой факторе таким образом, что остаток His84 может координировать молекулу воды для атаки на γ -фосфат ГТФ. Позиционирование боковой цепи остатка His84 в ГТФазном центре может приводить к повышению значения его константы диссоциации (pK_a) вследствие локализации нескольких отрицательных зарядов в непосредственной близости [34]. Это могло бы быть дополнительным подтверждением того, что остаток His84 действует как каталитическое основание для отрыва протона и активации воды, выступающей в роли нуклеофила для реакции гидролиза ГТФ на рибосоме (рис. 2, а) [17]. Для реализации такого механизма молекула воды, быстро протонирующая His84, должна оставаться в ГТФазном центре в виде гидроксид-иона вблизи отрицательно заряженного γ -фосфата достаточно долго для того, чтобы произошла относительно медленная нуклеофильная атака. Однако из-за сильного электростатического отталкивания связывание гидроксид-иона с γ -фосфатом, вероятно, будет очень нестабильным [35], и с высокой вероятностью гидроксид-ион будет замещен на молекулу воды-растворителя в более короткие сроки, чем произойдет реакция гидролиза ГТФ [25].

Молекула воды, скорее всего, ориентирована таким образом, что ее атомы водорода направлены в сторону от His84 и образуют водородные связи с карбонильным кислородом Thr61 и одним из атомов кислорода γ -фосфата, учитывая небольшое расстояние между нуклеофильной молекулой воды и фосфатом. При этом тес-

ный контакт между водой и ND1 His84 указывает на то, что остаток гистидина, находясь в протонированной форме, образует водородную связь с кислородом молекулы воды, тогда как азот другой боковой цепи образует водородную связь с фосфатной группой A2662 [25].

Более того, изучение зависимости гидролитической активности EF-Tu на рибосоме от pH не обнаружило таковой в диапазоне pH 6,0–8,5, что служит аргументом против механизма, при

котором His84 выступает в качестве каталитического основания в этом диапазоне значений pH [11, 12]. Причем похожие результаты были получены как для реакции гидролиза ГТФ, так и в случае использования аналога ГТФ гуанозин-5'-O-[γ-тио]трифосфата (GTP_γS), что подчеркивает корректность использования этого аналога ГТФ в данной реакции. Примечательно, что конформационные изменения в SelB, индуцируемые взаимодействием с GTP_γS, в значитель-

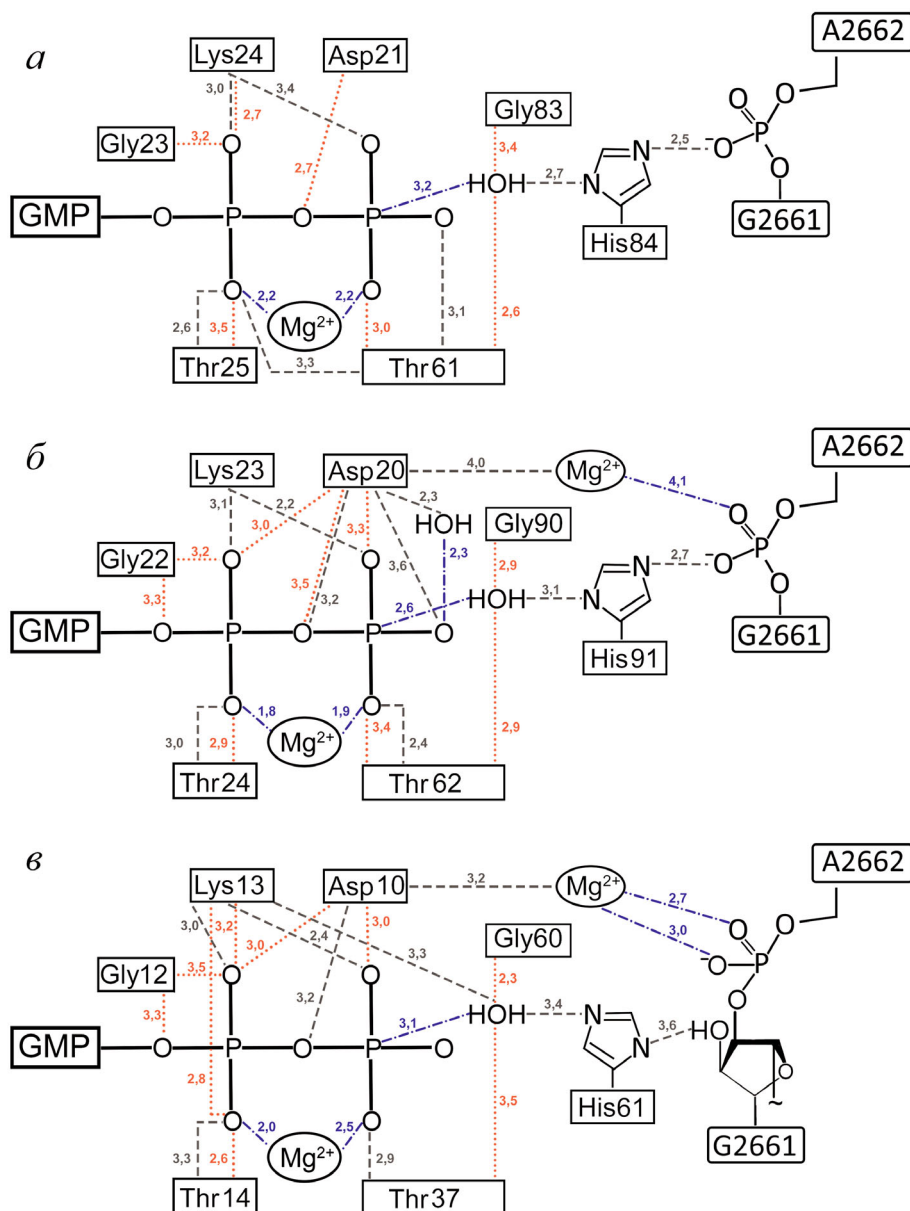


Рис. 1. Схематическое изображение активированного рибосомой нуклеотид-связывающего сайта EF-Tu (Protein Data Bank (PDB) идентификационный (ID) код 4v5l [17]) (а), EF-G (PDB ID код 4v9h [19]) (б) и SelB (PDB ID код 5lzd [20]) (в) с заменой аналогов ГТФ на ГТФ. Взаимодействия боковой группы а.о. (—), пептидного остова а.о. (· · ·), прочие взаимодействия (— · —). Расстояния указаны в Å. Нумерация в соответствии с последовательностью аминокислот в элонгационных факторах из *E. coli*. (С цветными вариантами рис. 1–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>.)

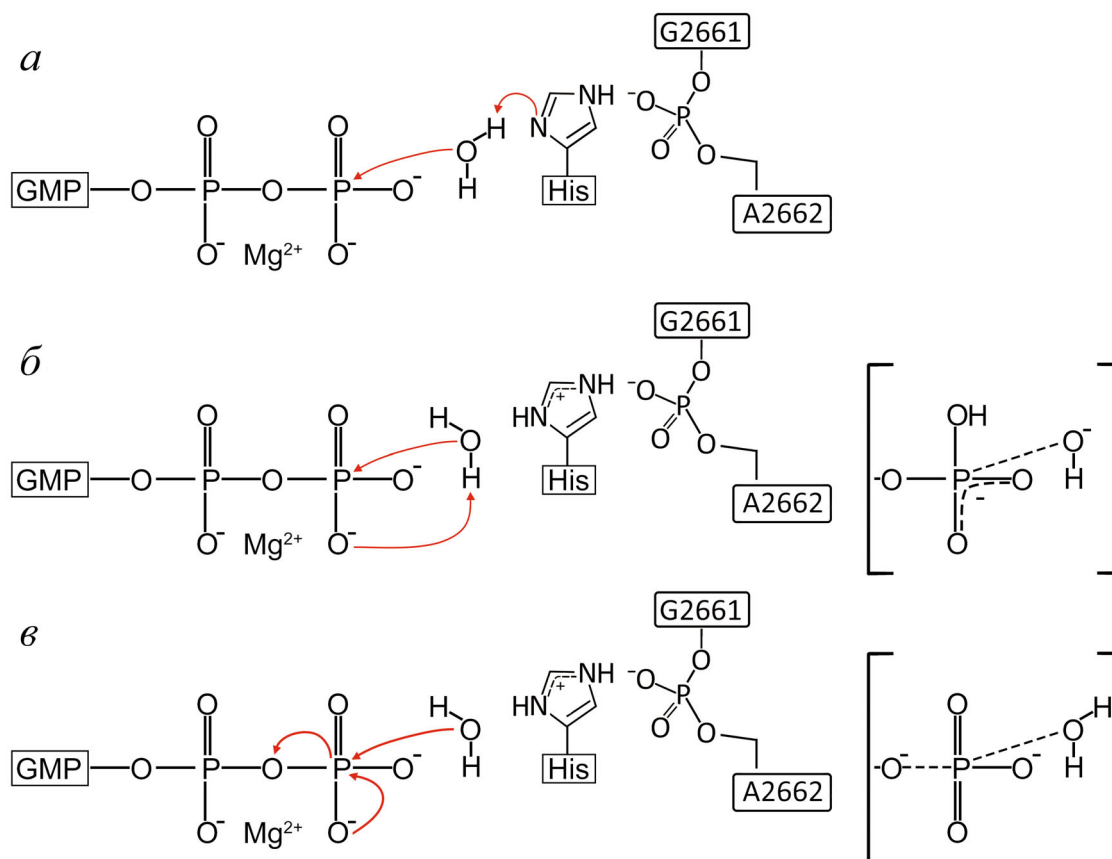


Рис. 2. Возможные механизмы реакции гидролиза ГТФ, соответствующие His84, выступающему в роли каталитического основания (*а*), ассоциативному (*б*) и диссоциативному (*в*) вариантам. Переходные состояния ассоциативного и диссоциативного вариантов указаны структурами в скобках

ной степени соответствовали таковым в присутствии ГТФ [36]. Напротив, комплекс с другим аналогом ГТФ, 5'-гуанилил-имидодифосфатом (GDPNP), больше напоминал неактивную конформацию белка SelB–ГДФ [36, 37]. Это указывает на то, что для обоих факторов элонгации, EF-Tu и SelB, более предпочтительным аналогом ГТФ является GTP γ S.

В свете приведенных выше аргументов наиболее реалистичным представляется сценарий, при котором состояние активного комплекса соответствует структуре, в которой молекула воды находится между γ -фосфатом и протонированным остатком His84 [24]. Этот вариант предполагает, что воздействие молекулы воды на фосфат включает перенос протона от молекулы воды к одному из фосфатных кислородов, а не к остатку гистидина. Возможны два предельных случая реализации такого механизма, соответствующих ассоциативному и диссоциативному путям (рис. 2, *б* и *в*) [38, 39]. Ассоциативный путь включает перенос протона на немостиковый кислород фосфата с последующей атакой гидроксид-иона. Второй предельный случай,

диссоциативный путь, соответствует отрыву метафосфата с последующей атакой незаряженной воды. В итоге перенос протона на уходящую группу ГДФ будет происходить либо через кислород фосфата, либо при участии дополнительных молекул воды.

Несмотря на десятилетия исследований детальный молекулярный механизм реакции гидролиза ГТФ до сих пор не до конца понятен и вызывает споры относительно пути протекания реакции и основы каталитической активности ГТФаз. В этом обзоре приводятся результаты анализа современной литературы по теме стимуляции ГТФазной активности трех факторов элонгации, EF-Tu, EF-G и SelB, а также механизма реакции гидролиза ГТФ. Примечательно, что существенно различающиеся аминокислотные последовательности этих белков складываются в схожие структуры G-домена для того, чтобы обеспечить взаимодействие функционально различных элонгационных факторов с одной и той же областью рибосомы и образовать практически одинаковые каталитические сайты, позволяя предположить наличие общего ме-

ханизма активации трГТФаз на рибосоме [2, 10]. Таким образом, данные, полученные для EF-Tu, EF-G и SelB, могут дополнять друг друга и способствовать составлению более целостной картины функционирования трГТФаз на рибосоме.

ФАКТОРЫ ЭЛОНГАЦИИ – G-БЕЛКИ

В процессе биосинтеза белка удлинение полипептидной цепи происходит за счет циклически повторяющихся этапов декодирования (доставки аминоацил-тРНК (aa-тРНК) в А сайт), образования пептидной связи и транслокации (перемещения рибосомы к следующему кодону мРНК). Высокая скорость и однонаправленность цикла элонгации реализуется благодаря функционированию трГТФаз факторов элонгации: EF-Tu, EF-G и SelB.

Элонгационный фактор EF-Tu является одной из наиболее изученных трГТФаз. Он состоит из трех доменов: домена I (G-домена), который связывает гуаниновый нуклеотид, и двух β -цилиндров – доменов II и III, которые вместе с доменом I обеспечивают поверхность связывания для акцепторной области aa-тРНК [40]. В своей активной ГТФ-связанной форме EF-Tu образует высокоаффинный комплекс с aa-тРНК и доставляет ее в А-сайт рибосомы [23, 41, 42]. Распознавание кодона мРНК антикодоном тРНК приводит к быстрому гидролизу ГТФ [43, 44]. При этом значительные конформационные изменения EF-Tu вызывают высвобождение акцепторного стебля aa-тРНК из EF-Tu и последующую диссоциацию EF-Tu–ГДФ из рибосомы [21, 45]. Рециркуляция неактивной (связанной с ГДФ) формы EF-Tu в EF-Tu–ГТФ катализируется фактором обмена нуклеотидов EF-Ts [46, 47].

Фактор элонгации EF-G состоит из 5 доменов [48]. Домен I (G-домен) связывает ГТФ/ГДФ и вместе с доменом II образует структурный супердомен, характерный для многих трГТФаз. Домены III–V специфичны для EF-G и необходимы для выполнения основной функции фактора – транслокации тРНК и экспонирования нового кодона мРНК в вакантном А сайте рибосомы. Помимо канонической функции по активации транслокации EF-G также участвует в рециркуляции рибосом – процессе, при котором рибосома после окончания синтеза полипептидной цепи диссоциирует на малую и большую рибосомные субъединицы для подготовки к трансляции следующей мРНК [49]. У большинства бактерий обе функции выполняются одним белком, однако в ряде случаев эти функции разделены между продуктами паралогичных генов [50]. В ГТФ-связанной форме EF-

G взаимодействует с рибосомой, что приводит к быстрому протеканию реакции гидролиза ГТФ, транслокации и последующему высвобождению EF-G–ГДФ и неорганического фосфата (P_i) из рибосомы [51]. Учитывая схожую аффинность EF-G к ГТФ и ГДФ, кинетическую подвижность комплекса фактора с нуклеотидом и высокую внутриклеточную концентрацию ГТФ, фактор может спонтанно обменять ГДФ на ГТФ без помощи фактора обмена нуклеотидов [52].

Специализированный элонгационный фактор SelB в процессе рекодирования стоп-кодона UGA доставляет к рибосоме селеноцистеинил-тРНК (Sec-тРНК^{Sec}) для встраивания неканонической аминокислоты селеноцистеина (Sec). SelB состоит из 4 доменов [53]. I–III домены структурно схожи с доменами EF-Tu и выполняют аналогичные функции: домен I (G-домен) взаимодействует с гуаниновым нуклеотидом и в комбинации со II и III доменами образует область для связывания тРНК. IV домен уникален и не встречается в других трГТФазах, он обеспечивает взаимодействие фактора со специфической вторичной структурой мРНК, так называемым SECIS-элементом (Sec Inserting Sequence), который у бактерий располагается сразу после UGA кодона и определяет встраивание Sec [54]. В отсутствие шпилькообразной SECIS-структуры в мРНК кодон будет распознаваться как терминирующий. В своей активной SelB–ГТФ форме фактор связывает Sec-тРНК^{Sec} с экстраординарно высокой аффинностью (0,2 пМ), что обеспечивает защиту лабильного остатка Sec от преждевременного гидролиза и окисления [55]. Нахождение тРНК-ассоциированного фактора в непосредственной близости от Sec-встраивающего кодона обеспечивается благодаря взаимодействию IV домена SelB со вторичной структурой мРНК. Гидролиз ГТФ фактором после распознавания кодона мРНК приводит к высвобождению и аккомодации тРНК на рибосоме, SelB–ГДФ теряет аффинность к рибосоме и шпильке мРНК и диссоциирует [20]. В свободном состоянии SelB легко обменивает ГДФ на ГТФ, так как обладает к последнему более высокой аффинностью [54, 55].

Несмотря на различные функции факторов элонгации, наличие общей области связывания с рибосомой, СРП рРНК, и схожее строение каталитического сайта позволяют предположить единый механизм активации гидролитической активности трГТФаз на рибосоме. При этом механизм реакции гидролиза ГТФ факторами в свободном состоянии вне рибосомы (спонтанный гидролиз) может отличаться от такового на рибосоме.

СПОНТАННЫЙ ГИДРОЛИЗ ГТФ ФАКТОРАМИ ЭЛОНГАЦИИ

Трансляционные ГТФазы обладают низкой спонтанной активностью гидролиза ГТФ, что, безусловно, оправдано с энергетической точки зрения. Изучение процесса гидролиза ГТФ факторами элонгации вне рибосомы, вероятно, не имеющего функционального значения в реальных условиях, может дать представление о механизме катализа и быть интересным с эволюционной точки зрения.

Во всех известных структурах свободных ГТФ-связанных факторов EF-Tu [56, 57], EF-G [58] и SelB [37, 59], а также в составе тройного комплекса, состоящего из EF-Tu, ГТФ и аа-тРНК [41], His84 ориентирован в направлении от γ -фосфата и не образует необходимых для активации реакции гидролиза взаимодействий (рис. 3, *a–в*). В структуре свободного фактора в активной конформации EF-Tu–ГТФ вращение боковой цепи His84 в направлении активного сайта затруднено остатками Val20 и Leu60, которые также называют «гидрофобными воротами» [6]. Функция данных остатков в случае свободного фактора в растворе – препятствие позиционированию молекулы воды между консервативным гистидином и ГТФ, а в случае фактора в комплексе с рибосомой – приближение избыточных молекул растворителя к реакционному центру. Таким образом, в несвязанном с рибосомой EF-Tu переориентация His84 в направлении γ -фосфата невозможна, и His84 не участвует в катализе (рис. 3, *a* и *г*). Данные анализа модифицированных вариантов фактора EF-Tu подтвердили данное предположение, продемонстрировав, что замена важного для активации реакции гидролиза ГТФ на рибосоме остатка His84 на ряд аминокислот не приводит к существенному изменению скорости спонтанного гидролиза EF-Tu–ГТФ вне рибосомы [12].

Достаточно распространенной является точка зрения о том, что сомкнутые «гидрофобные ворота» препятствуют активации гидролиза ГТФ не только в случае EF-Tu, но и в случае других элонгационных факторов, в частности EF-G [13]. Однако в большинстве имеющихся пространственных структур свободного фактора EF-G данные гидрофобные а.о. не разрешены [60, 61], а в единственной структуре с разрешенными «гидрофобными воротами» [58] данные остатки располагаются довольно далеко от остатка гистидина и не могут препятствовать активации гидролиза ГТФ фактором вне рибосомы (рис. 3, *б*). В случае SelB гомологичные остатки находятся приблизительно на одинаковом расстоянии друг от друга вне зависимости от того, находят-

ся ли SelB в свободном состоянии [59] или связан с рибосомой (рис. 3, *в* и *е*) [20]. Более того, анализ молекулярной динамики SelB–ГТФ–СестРНК^{Sec} в растворе предполагает, что инвариантный His61 способен быстро колебаться между неактивной (направленной в сторону от γ -фосфата) и активной (направленной к γ -фосфату) конформациями, а остатки Val9 и Met36, гомологичные остаткам «гидрофобных ворот» в EF-Tu и EF-G, могут свободно раздвигаться [20]. Эти данные указывают на то, что, в отличие от EF-Tu, в EF-G и SelB «гидрофобные ворота» не блокируют возможность взаимодействия предположительно каталитического остатка гистидина с γ -фосфатом ГТФ. Возможно, именно с этим связан тот факт, что при переходе от активированной рибосомой реакции к собственной гидролитической активности фактора скорость гидролиза EF-Tu–ГТФ снижается на семь порядков [12], тогда как для EF-G и SelB это значение достигает лишь четырех порядков [13, 20]. Таким образом, механизм реакции спонтанного гидролиза элонгационными факторами может различаться, несмотря на высокую степень консерватизма в структуре ГТФ-связывающего домена. His84, скорее всего, не участвует в катализе реакции гидролиза ГТФ свободным EF-Tu, однако может принимать участие в формировании каталитического центра в случае EF-G и SelB. Увеличение скорости реакции гидролиза EF-G–ГТФ и SelB при взаимодействии с рибосомой на четыре порядка может объясняться дополнительной стабилизацией активированного состояния, отсутствующей в случае свободных факторов. Для подтверждения этой теории необходимы дальнейшие структурные и биохимические исследования, поскольку на данный момент существуют некоторые расхождения в данных, не позволяющие однозначно установить возможность участия гистидина в реакции гидролиза ГТФ в свободном EF-G. Так, результаты исследования Cunha et al. [14] демонстрируют полное исчезновение гидролитической активности EF-G даже в присутствии рибосом в случае замены His на Ala, тогда как в исследовании, проведенном Kogipella et al. [13], аналогичная замена приводит лишь к десятикратному снижению скорости реакции гидролиза ГТФ фактором EF-G на рибосомах и практически не имеет эффекта в случае свободного фактора. Экспериментальное подтверждение потенциальной роли консервативного остатка His в гидролизе ГТФ SelB пока отсутствует.

Возможность разных вариантов механизма гидролиза изолированными факторами можно объяснить различиями в каталитическом центре

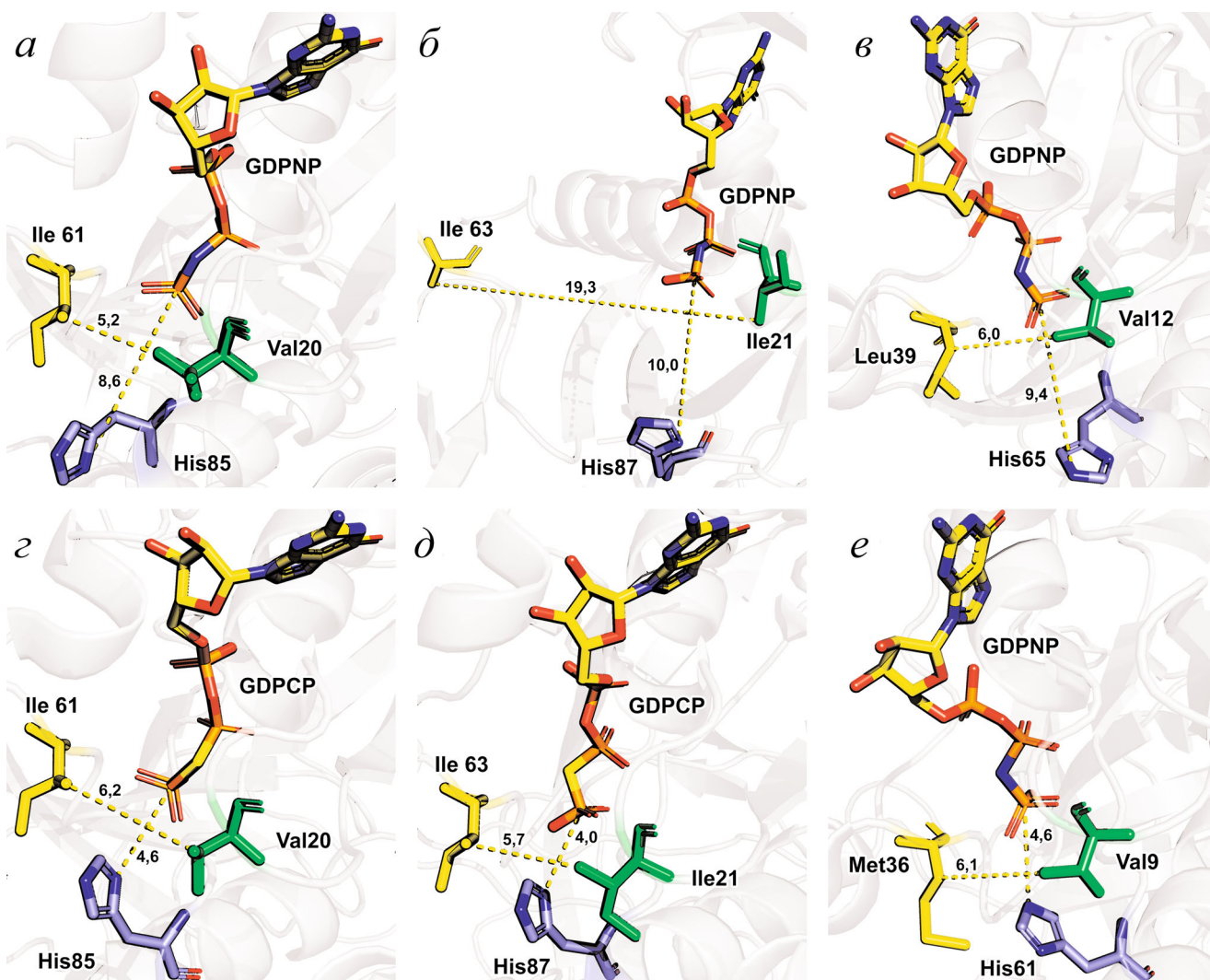


Рис. 3. Взаимное расположение остатка инвариантного His, аналога ГТФ и а.о. «гидрофобных ворот» EF-Tu (PDB ID код 1exm [57]) (а), EF-G (PDB ID код 2bv3 [58]) (б) и SelB (PDB ID код 4zu9 [59]) (в) в изолированном состоянии, EF-Tu (PDB ID код 4v51 [17]) (г), EF-G (PDB ID код 4v90 [18]) (д) и SelB (PDB ID код 5lzd [20]) (е) в связанном с рибосомой состоянии. Расстояния указаны в Å

EF-Tu и EF-G. Так, критически важный для реакции гидролиза на рибосоме остаток Asp21 Р-петли находится в активированном положении в EF-Tu как на рибосоме, так и в свободном состоянии, тогда как в EF-G правильная ориентация данного остатка достигается только при взаимодействии фактора с рибосомами [19]. В отличие от His84, Asp21, вероятно, участвует в реакции гидролиза EF-Tu–ГТФ вне рибосомы, так как при замене остатка His скорость реакции спонтанного гидролиза EF-Tu практически не изменяется, тогда как замена Asp21 на ряд аминокислот приводит к снижению гидролитической активности фактора вне рибосомы [12]. Более того, было показано, что ион K^+ играет роль структурного кофактора и стимулирует собственную ГТФазную активность EF-Tu [62].

Активация достигается благодаря связыванию моновалентного катиона между консервативным остатком Asp и инвариантным остатком Gly в регионе switch II [63], тогда как замена Asp на Ala приводит к неспособности модифицированного варианта белка координировать ион K^+ , что нивелирует стимулирующий эффект [12].

Таким образом, можно предположить, что механизмы спонтанной гидролитической активности могут различаться для разных факторов. И если для EF-G и SelB есть основания полагать, что важным является остаток His региона switch II, то для спонтанной гидролитической активности EF-Tu большее значение имеет остаток Asp21 Р-петли. Однако нельзя исключать и вариант, при котором ни один из этих остатков не участвует в реакции гидролиза ГТФ изо-

лированными факторами элонгации, а процесс реализуется по некоторому иному, пока не идентифицированному механизму.

ВНЕШНЯЯ СТИМУЛЯЦИЯ ГТФазной АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ЭЛОНГАЦИИ

Достаточно низкая спонтанная гидролитическая активность трГТФаз значительно стимулируется при взаимодействии с СРП 23S рРНК большой рибосомной субъединицы [17, 31, 64], которая представляет собой одну из наиболее высоко консервативных последовательностей рРНК. Конец этой петли близко подходит к связанной молекуле ГТФ в соответствующих G-доменах трГТФаз [17, 64].

Помимо взаимодействия с СРП, трГТФазы могут иметь дополнительные элементы, стимулирующие ГТФазную активность, что является принципиальным для выполнения их функции. Так, поскольку основная функция EF-Tu — доставка aa-тРНК для удлинения полипептидной цепочки, важной дополнительной детерминантой является кодон-антикодонное взаимодействие, обеспечивающее распознавание корректной аминокислоты. Поэтому взаимодействие EF-Tu с вакантными рибосомами приводит лишь к некоторому стимулирующему эффекту, тогда как максимальное значение активации гидролиза (ускорение реакции гидролиза на шесть порядков) достигается в том случае, когда, помимо взаимодействия с СРП, происходит распознавание кодона мРНК на малой рибосомной субчастице [12]. Логично, что в случае SelB, который должен доставить SestРНК^{Sec} на рибосому, когда в А-сайте располагается стоп-кодон, обозначающий место встраивания Sec, а не окончание синтеза белковой цепи, добавляется еще одна детерминанта-стимулятор ГТФазной активности фактора. Для активации гидролитической функции SelB, помимо СРП и кодон-антикодонного взаимодействия, необходимо взаимодействие VI домена SelB с SECIS-элементом мРНК, который располагается сразу после Sec-определяющего кодона. Отсутствие кодон-антикодонного взаимодействия или взаимодействия с SECIS-элементом мРНК приводит к снижению скорости реакции гидролиза на два порядка [20].

Механизм активации трГТФаз лучше всего изучен на примере элонгационного фактора EF-Tu [10]. В составе тройного комплекса aa-тРНК прочно связана с EF-Tu—ГТФ [65], взаимодействуя в том числе и с регуляторными регионами switch I и II G-домена элонгационного фактора своим акцепторным стеблем [41]. Доставка aa-

тРНК к транслирующей рибосоме приводит к возникновению дополнительных контактов антикодона тРНК с кодоном мРНК, экспонированным в А-сайте рибосомы [17, 22, 44]. Именно корректное кодон-антикодонное взаимодействие является триггером продуктивных конформационных перестроек в тРНК, рибосоме и EF-Tu, ведущих к активации ГТФазной функции. Закрепление антикодона тРНК в центре декодирования на 30S рибосомной субъединице приводит к деформации молекулы тРНК [66], в результате которой происходит приближение EF-Tu к СРП [21] и, вероятно, изменение конформации региона switch II с переориентацией незаменимого остатка His84 EF-Tu [43]. В таком активированном состоянии боковая цепь His84 направлена на γ -фосфат ГТФ через «гидрофобные ворота» и образует водородные связи с нуклеофильной молекулой воды и с фосфатным кислородом нуклеотида A2662 СРП (рис. 1, а и 3, з) [17, 22]. Дополнительную стабилизацию конформации переходного состояния фактора осуществляют нуклеотиды СРП 23S рРНК большой субъединицы рибосомы, обширные взаимодействия которых с switch-регионами домена G были визуализированы при помощи реконструкции методом криоэлектронной микроскопии структуры тройного комплекса на рибосоме в момент после реакции гидролиза ГТФ, но до конформационной перегруппировки в ГДФ-форму [32, 67]. Гидролиз ГТФ дестабилизирует switch-регион EF-Tu [45, 68], приводит к ослаблению взаимодействия фактора элонгации с aa-тРНК и СРП и, в конечном счете, к диссоциации EF-Tu—ГДФ.

Принципиальная значимость остатка гистидина в положении 84 EF-Tu для гидролиза ГТФ на рибосоме была неоспоримо доказана мутационным анализом [11, 12, 15, 16]. Замена His на Leu, Ala и Arg приводила к значительному снижению скорости реакции, приближающемуся по значению к скорости реакции гидролиза ГТФ фактором вне рибосомы. При этом замена His84 на Gln, обнаруживаемый в данном положении в Ras-подобных и гетеротримерных G-белках, приводила к менее выраженному снижению скорости реакции гидролиза ГТФ, позволяя предположить, что NH₂-группа Gln может в некоторой степени заменить NH-группу His в регионе switch II трГТФаз и стабилизировать переходное состояние гидролиза ГТФ, как и в других группах G-белков [69]. Следует отметить, что для реализации данного механизма в случае EF-Tu критически важным является раскрытие «гидрофобных ворот», а также взаимодействие His84 с A2662 СРП большой рибосомной субъединицы, тогда как в отсутствие рибосомы гид-

ролиз ГТФ, вероятно, протекает по другому механизму, который не вовлекает боковую цепь His84 региона switch II EF-Tu.

Несмотря на то, что благодаря структурным и биохимическим исследованиям были определены основные элементы каталитического центра реакции, возможные пути протекания реакции до сих пор являются дискуссионными.

РОЛЬ ОСТАТКА КОНСЕРВАТИВНОГО ГИСТИДИНА В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГТФ

Для определения роли остатка His в реакции гидролиза EF-Tu–ГТФ использовали метод компьютерного моделирования молекулярной динамики [25] на основе существующей кристаллической структуры комплекса рибосом с EF-Tu–GDPСР [17]. Сравнение энергий нескольких возможных процессов в ГТФазном центре рибосомы и в водном растворе показало, что механизм, при котором His84 действует как каталитическое основание (с нуклеофильной атакой и захватом протона His84) (рис. 2, а), крайне маловероятен из-за значительной дестабилизации (+17,5 ккал·моль⁻¹), возникающей в результате близкого расположения гидроксида к γ -фосфату. Анализ свободной энергии реакций образования промежуточного соединения в процессе гидролиза ГТФ выявил практически одинаковые значения стабилизации для предельных случаев диссоциативного (–3,4 ккал·моль⁻¹) и ассоциативного (–3,7 ккал·моль⁻¹) механизмов реакции гидролиза ГТФ. В первом случае образуются переходные комплексы с метафосфатом, находящимся между нейтральной молекулой воды и уходящим ГДФ (рис. 2, в). При этом отсутствует взаимодействие между боковой цепью His84 и метафосфатом, который в основном стабилизируется взаимодействием с Lys24, основными NH-группами Thr61 и Gly83, а также со связанным с субстратом ионом Mg²⁺. Во втором случае перенос протона воды на γ -фосфат в присутствии положительно заряженного остатка His84 приводит к стабильному положению гидроксид-иона (рис. 2, б), которое хорошо согласуется с кристаллической структурой [17]. Гидроксид-ион располагается в структуре оксианионовой дыры, которая образуется пептидным остовом трех а.о. (Pro82–Gly83–His84) окончания консервативного мотива региона switch II DXXGH и боковой цепью активной протонированной формы His84 (рис. 4). В этом случае гидроксид-ион также последовательно сохраняет свою водородную связь с карбонильной группой Thr61. Несмотря на равную вероятность реализации обоих механизмов, с точки зрения мо-

лекулярной динамики, есть некоторые аспекты, которые позволяют представить ассоциативный путь более обоснованным. Структура оксианионовой дыры идеально приспособлена для размещения и стабилизации отрицательного заряда, тогда как в случае реализации диссоциативного механизма в ней будет располагаться нейтральная молекула воды. При этом прогнозируемая роль His84 при диссоциативном механизме будет менее значимой, чем в случае ассоциативного механизма, при реализации которого большой предполагаемый эффект наличия His84 в активном состоянии хорошо согласуется с принципиальной значимостью остатка His в положении 84, подтвержденной экспериментально [11, 12]. Оба вышеуказанных аспекта свидетельствуют в пользу именно ассоциативного механизма реакции гидролиза ГТФ, который, скорее всего, можно распространить и на случаи других трГТФаз [70–72].

Важно отметить, что структура оксианионовой дыры, образованная мотивом PGN вместе с NH-группой главной цепи Thr61 и боковой цепью His84, формирует полость, которая может стабилизировать не только гидроксид-ион, но и уходящую фосфатную группу [25]. Стабилизация неорганического фосфата в нуклеотид-связывающем кармане может быть причиной его замедленного по сравнению со скоростью протекания реакции гидролиза ГТФ высвобождения [73].

Помимо координирования каталитической молекулы воды и формирования оксианионовой дыры, боковая цепь His также может участвовать в высвобождении P_i после реакции гидролиза ГТФ, что является необходимым условием для диссоциации трГТФаз с рибосомы [74].

Изучение структурных особенностей EF-G на рибосоме выявило радикальное изменение ориентации His91 при гидролизе ГТФ. В структурах, содержащих EF-G с негидролизующимся аналогом ГТФ (активированное состояние перед реакцией гидролиза), боковая цепь His91 указывает на γ -фосфат [18, 19], тогда как в структурах с EF-G–ГДФ и фосидовой кислотой она поворачивается на 140° в противоположном направлении и оказывается в междоменном пространстве EF-G [64, 75]. Если в соответствии с данными молекулярно-динамического моделирования P_i остается связанным с His91 после реакции гидролиза ГТФ, наиболее вероятно, что он, следуя за His91, оказывается в области, представляющей собой беспрепятственный выходной путь, и покидает рибосому [13]. В поддержку этой теории говорят эксперименты с модифицированными вариантами EF-G, в которых His91 был заменен на Ala, Glu, Gln и Arg [13]. В

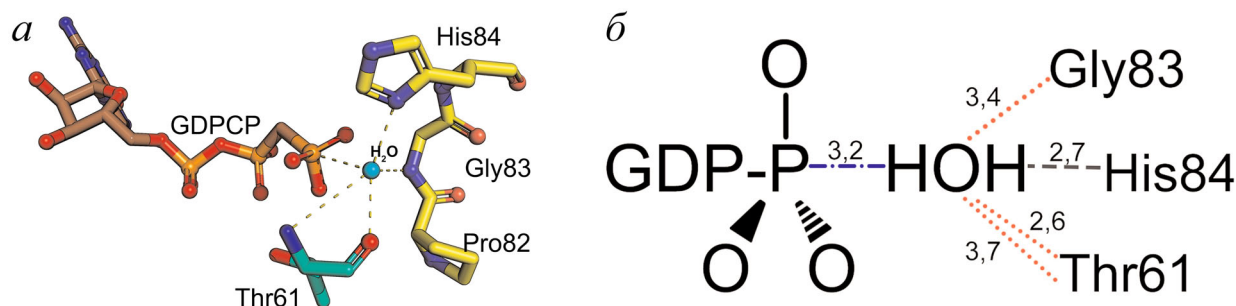


Рис. 4. Пространственная структура (а) и схематическое изображение (б) расположения молекулы воды в оксианионной дыре, образованной пептидным остовом а.о. Pro82–Gly83–His84, боковой цепью протонированной формы His84 и NH-группой главной цепи Thr61 EF-Tu (PDB ID код 4v5l [17]). Взаимодействия боковой группы а.о. (—), пептидного остова а.о. (···), прочие взаимодействия (— · —). Расстояния указаны в Å. Нумерация *E. coli*

соответствии с эффектами, обнаруженными для EF-Tu, замена консервативного His приводила к разной степени нарушения гидролитической активности фактора в зависимости от а.о., оказывающегося в реакционном центре. При этом во всех случаях относительное снижение скорости высвобождения P_i превосходило нарушение реакции гидролиза. Таким образом, можно предположить, что тесная координация P_i с His91 и переориентация боковой цепи этого а.о. являются важными определяющими факторами для эффективного высвобождения P_i [13].

РОЛЬ ОСТАТКА КОНСЕРВАТИВНОЙ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ГТФ

Еще одним консервативным среди трГТФаз остатком, способствующим ускорению реакции гидролиза ГТФ на рибосомах, является остаток аспарагиновой кислоты Р-петли. Замена Asp21 на другие а.о. приводила к более выраженному снижению скорости реакции гидролиза ГТФ, стимулированной рибосомами, чем к изменению спонтанной гидролитической активности EF-Tu [12].

В EF-G Asp20 обеспечивает оптимальную ориентацию β - и γ -фосфатов. Asp20, аналогично His91, указывает в сторону от связанного нуклеотида в изолированном состоянии EF-G, но при взаимодействии с рибосомой переориентируется и приближается к ГТФ [19]. Asp20 контактирует с мостиковым кислородом, соединяющим β - и γ -фосфаты ГТФ, а также с кислородами этих фосфатных групп (рис. 1, б). Подобно His91, Asp20 приближает к γ -фосфату молекулу воды, которая может играть роль в катализе, образуя водородную связь с кислородом γ -фосфата. Активированная конформация Asp20 стабилизируется двумя ионами Mg^{2+} , которые коор-

динируются нуклеотидами GAGA области СРП (G2659–A2662) в полном соответствии с данными о том, что эти нуклеотиды являются важными детерминантами эффективного гидролитического функционирования EF-G [30, 76].

В отличие от EF-G, в EF-Tu и SelB, Asp Р-петли находится в активированном, повернутом в сторону ГТФ состоянии постоянно, и для этого не требуется взаимодействие с рибосомой. Однако при связывании с СРП расстояние между Asp и гуаниновым нуклеотидом уменьшается и образуются связи, координирующие положение β - и γ -фосфатов ГТФ [20]. В рибосомном комплексе с SelB дополнительная стабилизация достигается за счет координации Asp фосфатной группой A2662 через ион Mg^{2+} , аналогично EF-G, тогда как в EF-Tu этот контакт не был обнаружен (рис. 1). Интересно, что различия между факторами элонгации проявляются также и в координации активного протонированного His84 нуклеотидами СРП. Для EF-Tu и EF-G это контакт фосфатного кислорода A2662 с NE2-группой His, тогда как в случае SelB – это взаимодействие 2' OH-группы G2661 с ND1-группой His [17, 19, 20].

Значимость координации критически важных а.о. ГТФазного центра EF-G (His91 и Asp20) нуклеотидом A2662 была оценена путем замены фосфатных кислородов A2662 на метильные группы [76]. Было показано, что нарушение электростатического взаимодействия A2662 с His91 путем замены одного из двух неравнозначных кислородов на метильную группу приводит к полной потере способности фактора гидролизовать ГТФ. При этом замена второго кислорода фосфатной группы с нейтрализацией ее отрицательного заряда сохраняла реакционную способность фактора элонгации, приводя лишь к 8× снижению скорости реакции. С одной стороны, этот эффект можно объяснить общим снижением значения отрицательного заря-

да в основной цепи A2662, тогда как отрицательный заряд должен способствовать увеличению pK_a остатка His, обеспечить протонирование имидазольного кольца [25] и позволить образовать прочную водородную связь с молекулой каталитической воды. С другой стороны, замена кислорода на метильную группу приводит к неспособности A2662 координировать ион Mg^{2+} , который, в свою очередь, призван стабилизировать активную конформацию Asp20 [19]. Слабо выраженное снижение реакционной способности фактора может объясняться тем фактом, что достаточно большой радиус гидратированного иона Mg^{2+} может обеспечить его координацию другими нуклеотидами СРП, например G2655 или G2664. Более того, в стабилизации Asp20 EF-G участвует второй ион Mg^{2+} , координация которого нуклеотидом G2659 сохраняется [19].

Таким образом, несмотря на некоторые различия, возникающие на этапе активации ГТФазной активности факторов элонгации, достигается очень схожее активированное состояние, в котором процесс гидролиза ГТФ во многом определяется электростатическими взаимодействиями. Протонированный остаток His стимулирует перенос протона каталитической воды на γ -фосфатную группу ГТФ с последующей нуклеофильной атакой гидроксид-иона.

При этом отрицательно заряженный γ -фосфат перемещается в результате однонаправленных воздействий остатков Asp21 и His84 и стабилизируется консервативным мотивом PGN. Рибосома не предоставляет каталитические остатки, но стимулирует реакцию гидролиза, стабилизируя продуктивную конформацию каталитического центра [77]. Таким образом, ускорение реакции гидролиза ГТФ на несколько порядков, осуществляемое рибосомой, достигается исключительно электростатическими эффектами стабилизации и экранирования [12, 78, 79], являясь удивительным примером чрезвычайно продуктивного использования ограниченной каталитической силы РНК [80].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01416).

Благодарности. Мы благодарим за плодотворные дискуссии всех сотрудников лаборатории биосинтеза белка ОМРБ НИЦ «КИ» — ПИЯФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmeing, T. M., and Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation, *Nature*, **461**, 1234-1242, Doi: 10.1038/nature08403.
- Maracci, C., and Rodnina, M. V. (2016) Review: translational GTPases, *Biopolymers*, **105**, 463-475, doi: 10.1002/bip.22832.
- Atkinson, C. G. (2015) The evolutionary and functional diversity of classical and lesser-known cytoplasmic and organellar translational GTPases across the tree of life, *BMC Genomics*, **16**, 78, doi: 10.1186/s12864-015-1289-7.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature*, **349**, 117-127, doi: 10.1038/349117a0.
- Vetter, I. R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J., and Wittinghofer, A. (1999) Structure of a ran-binding domain complexed with ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport, *Nature*, **398**, 39-46, doi: 10.1038/17969.
- Hilgenfeld, R. (1995) Regulatory GTPases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 810-817, doi: 10.1016/0959-440X(95)80015-8.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic ras mutants, *Science*, **277**, 333-338, doi: 10.1126/science.277.5324.333.
- Wittinghofer, A., Scheffzek, K., and Ahmadian, M. R. (1997) The Interaction of ras with GTPase-activating proteins, *FEBS Lett.*, **410**, 63-67, doi: 10.1016/S0014-5793(97)00321-9.
- Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science*, **294**, 1299-1304, doi: 10.1126/science.1062023.
- Ævarsson, A. (1995) Structure-based sequence alignment of elongation factors Tu and G with related GTPases involved in translation, *J. Mol. Evol.*, **41**, 1096-104, doi: 10.1007/BF00173191.
- Daviter, T., Wieden, H. J., and Rodnina, M. V. (2003) Essential role of histidine 84 in elongation factor Tu for the chemical step of GTP hydrolysis on the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **332**, 689-699, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00947-1.
- Maracci, C., Peske, F., Dannies, E., Pohl, C., and Rodnina, M. V. (2014) Ribosome-induced tuning of GTP hydrolysis by a translational GTPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14418-14423, doi: 10.1073/pnas.1412676111.
- Koripella, R. K., Holm, M., Dourado, D., Mandava, C. S., Flores, S., and Sanyal, S. (2015) A conserved histidine in switch-II of EF-G moderates release of inorganic phosphate, *Sci. Rep.*, **5**, doi: 10.1038/srep12970.
- Cunha, C. E., Belardinelli, R., Peske, F., Holtkamp, W., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. V. (2013) Dual use of GTP hydrolysis by elongation factor G on the ribosome, *Translation*, **1**, e24315-11, doi: 10.4161/trla.24315.

15. Zeidler, W., Egle, C., Ribeiro, S., Wagner, A., Katunin, V., Kreuzer, R., Rodnina, M., Wintermeyer, W., and Sprinzl, M. (1995) Site-directed mutagenesis of *Thermus Thermophilus* elongation factor Tu: replacement of His85, Asp81 and Arg300, *Eur. J. Biochem.*, **229**, 596-604, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.0596j.x.
16. Scarano, G., Krab, I. M., Bocchini, V., and Parmeggiani, A. (1995) Relevance of histidine-84 in the elongation factor Tu GTPase activity and in poly(Phe) synthesis: its substitution by glutamine and alanine, *FEBS Lett.*, **365**, 214-218, doi: 10.1016/0014-5793(95)00469-P.
17. Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2010) The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome, *Science*, **330**, 835-838, doi: 10.1126/science.1194460.
18. Chen, Y., Feng, S., Kumar, V., Ero, R., and Gao, Y. G. (2013) Structure of EF-G-ribosome complex in a pre-translocation state, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1077-1084, doi: 10.1038/nsmb.2645.
19. Tourigny, D. S., Fernández, I. S., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2013) Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation, *Science*, **340**, 1235490-1235497, doi: 10.1126/science.1235490.
20. Fischer, N., Neumann, P., Bock, L. V., Maracci, C., Wang, Z., Paleskava, A., Konevega, A. L., Schröder, G. F., Grubmüller, H., Ficner, R., Rodnina, M. V., and Stark, H. (2016) The pathway to GTPase activation of elongation factor SelB on the ribosome, *Nature*, **540**, 80-85, doi: 10.1038/nature20560.
21. Loveland, A. B., Demo, G., and Korostelev, A. A. (2020) Cryo-EM of elongating ribosome with EF-Tu • GTP elucidates TRNA proofreading, *Nature*, **584**, 640-645, doi: 10.1038/s41586-020-2447-x.
22. Loveland, A. B., Demo, G., Grigorieff, N., and Korostelev, A. A. (2017) Ensemble Cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity, *Nature*, **546**, 113-117, doi: 10.1038/nature22397.
23. Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., and Stark, H. (2015) Structure of the *E. Coli* ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected Cryo-EM, *Nature*, **520**, 567-570, doi: 10.1038/nature14275.
24. Liljas, A., Ehrenberg, M., and Åqvist, J. (2011) Comment on "The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome", *Science*, **333**, 37, doi: 10.1126/science.1202472.
25. Wallin, G., Kamerlin, S. C. L., and Åqvist, J. (2013) Energetics of activation of GTP hydrolysis on the ribosome, *Nat. Commun.*, **4**, 1733, doi: 10.1038/ncomms2741.
26. Li, W., Liu, Z., Koripella, R. K., Langlois, R., Sanyal, S., and Frank, J. (2015) Activation of GTP hydrolysis in mRNA-TRNA translocation by elongation factor G, *Sci. Adv.*, **1**, e1500169-7, doi: 10.1126/sciadv.1500169.
27. Mercier, E., Girodat, D., and Wieden, H. J. (2015) A Conserved P-loop anchor limits the structural dynamics that mediate nucleotide dissociation in EF-Tu, *Sci. Rep.*, **5**, doi: 10.1038/srep07677.
28. Shi, X., Khade, P. K., Sanbonmatsu, K. Y., and Joseph, S. (2012) Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis, *J. Mol. Biol.*, **419**, 125-138, doi: 10.1016/j.jmb.2012.03.016.
29. Mitkevich, V. A., Shyp, V., Petrushanko, I. Y., Soosaar, A., Atkinson, G. C., Tenson, T., Makarov, A. A., and Haurlyuk, V. (2012) GTPases IF2 and EF-G bind GDP and the SRL RNA in a mutually exclusive manner, *Sci. Rep.*, **2**, 843, doi: 10.1038/srep00843.
30. Clementi, N., Chirkova, A., Puffer, B., Micura, R., and Polacek, N. (2010) Atomic mutagenesis reveals A2660 of 23S ribosomal RNA as key to EF-G GTPase activation, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 344-351, doi: 10.1038/nchembio.341.
31. Moazed, D., Robertson, J. M., and Noller, H. F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA, *Nature*, **334**, 362-364, doi: 10.1038/334362a0.
32. Stark, H., Rodnina, M. V., Wieden, H. J., Zemlin, F., Wintermeyer, W., and Van Heel, M. (2002) Ribosome interactions of aminoacyl-TRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 849-854, doi: 10.1038/nsb859.
33. Lin, J., Gagnon, M. G., Bulkley, D., and Steitz, T. A. (2015) Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during TRNA translocation, *Cell*, **160**, 219-227, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.049.
34. Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2011) Response to comment on "The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome", *Science*, **333**, 37, doi: 10.1126/science.1202532.
35. Kirby, A. J., and Jencks, W. P. (1965) The reactivity of nucleophilic reagents toward the P-nitrophenyl phosphate dianion, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3209-3216, doi: 10.1021/ja01092a036.
36. Paleskava, A., Konevega, A. L., and Rodnina, M. V. (2012) Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB, *J. Biol. Chem.*, **287**, 27906-27912, doi: 10.1074/jbc.M112.366120.
37. Leibundgut, M., Frick, C., Thanbichler, M., Böck, A., and Ban, N. (2005) Selenocysteine TRNA-specific elongation factor SelB is a structural chimaera of elongation and initiation factors, *EMBO J.*, **24**, 11-22, doi: 10.1038/sj.emboj.7600505.
38. Klähn, M., Rosta, E., and Warshel, A. (2006) On the mechanism of hydrolysis of phosphate monoesters dianions in solutions and proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15310-15323, doi: 10.1021/ja065470t.
39. Åqvist, J., Kolmodin, K., Florian, J., and Warshel, A. (1999) Mechanistic alternatives in phosphate monoester hydrolysis: what conclusions can be drawn from available experimental data? *Chem. Biol.*, **6**, 71-80, doi: 10.1016/S1074-5521(99)89003-6.
40. Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C. O. A., Schirmer, N. K., Sprinzl, M., and Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements, *Nature*, **365**, 126-132, doi: 10.1038/365126a0.
41. Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. F. C., and Nyborg, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-TRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog, *Science*, **270**, 1464-1472, doi: 10.1126/science.270.5241.1464.
42. Fislage, M., Zhang, J., Brown, Z. P., Mandava, C. S., Sanyal, S., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2018) Cryo-EM shows stages of initial codon selection on the ribosome by Aa-TRNA in ternary complex with GTP and the GTPase-deficient EF-TuH84A, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 5861-5874, doi: 10.1093/nar/gky346.
43. Rodnina, M. V., Fricke, R., Kuhn, L., and Wintermeyer, W. (1995) Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome, *EMBO J.*, **14**, 2613-2619, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07259.x.
44. Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. V. (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-TRNA to the A site of the *E. Coli* ribosome, *EMBO J.*, **17**, 7490-7497, doi: 10.1093/emboj/17.24.7490.

45. Yang, H., Perrier, J., and Whitford, P. C. (2018) Disorder guides domain rearrangement in elongation factor Tu, *Proteins*, **86**, 1037-1046, doi: 10.1002/prot.25575.
46. Abel, K., Yoder, M. D., Hilgenfeld, R., and Jurnak, F. (1996) An α to β conformational switch in EF-Tu, *Structure*, **4**, 1153-1159, doi: 10.1016/S0969-2126(96)00123-2.
47. Gromadski, K. B., Wieden, H. J., and Rodnina, M. V. (2002) Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu, *Biochemistry*, **41**, 162-169, doi: 10.1021/bi015712w.
48. AEvansson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., Al-Karadaghi, S., Svensson, L. A., and Liljas, A. (1994) Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus Thermophilus*, *EMBO J.*, **13**, 3669-3677, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06676.x.
49. Janosi, L., Hara, H., Zhang, S., and Kaji, A. (1996) Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF) – an important but overlooked step of protein biosynthesis, *Adv. Biophys.*, **32**, 121-201, doi: 10.1016/0065-227X(96)84743-5.
50. Margus, T., Remm, M., and Tenson, T. (2011) A computational study of elongation factor G (EFG) duplicated genes: diverged nature underlying the innovation on the same structural template, *PLoS One*, **6**, e22789, doi: 10.1371/journal.pone.0022789.
51. Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., and Wintermeyer, W. (1997) Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives TRNA movement on the ribosome, *Nature*, **385**, 37-41, doi: 10.1038/385037a0.
52. Wilden, B., Savelsbergh, A., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2006) Role and timing of GTP binding and hydrolysis during EF-G-dependent TRNA translocation on the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13670-13675, doi: 10.1073/pnas.0606099103.
53. Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P., and Böck, A. (1996) Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB, *J. Mol. Biol.*, **262**, 413-420, doi: 10.1006/jmbi.1996.0525.
54. Thanbichler, M., Böck, A., and Goody, R. S. (2000) Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia Coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA, *J. Biol. Chem.*, **275**, 20458-20466, doi: 10.1074/jbc.M002496200.
55. Paleskava, A., Konevega, A. L., and Rodnina, M. V. (2010) Thermodynamic and kinetic framework of selenocysteyl-TRNA^{Sec} recognition by elongation factor SelB, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3014-3020, doi: 10.1074/jbc.M109.081380.
56. Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S., and Nyborg, J. (1993) The Crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus Aquaticus* in the GTP conformation, *Structure*, **1**, 35-50, doi: 10.1016/0969-2126(93)90007-4.
57. Hilgenfeld, R. (2000) Insights into the GTPase mechanism of EF-Tu from structural studies, in: *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*, (Garrett, R., ed.), Washington, DC, pp. 347-357.
58. Hansson, S., Singh, R., Gudkov, A. T., Liljas, A., and Logan, D. T. (2005) Crystal structure of a mutant elongation factor G trapped with a GTP analogue, *FEBS Lett.*, **579**, 4492-4497, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.016.
59. Itoh, Y., Sekine, S. I., and Yokoyama, S. (2015) Crystal structure of the full-length bacterial selenocysteine-specific elongation factor SelB, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 9028-9038, doi: 10.1093/nar/gkv833.
60. Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (1994) The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution, *EMBO J.*, **13**, 3661-3668, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06675.x.
61. Hansson, S., Singh, R., Gudkov, A. T., Liljas, A., and Logan, D. T. (2005) Structural insights into fusidic acid resistance and sensitivity in EF-G, *J. Mol. Biol.*, **348**, 939-949, doi: 10.1016/j.jmb.2005.02.066.
62. Fasano, O., De Vendittis, E., and Parmeggiani, A. (1982) Hydrolysis of GTP by elongation factor Tu can be induced by monovalent cations in the absence of other effectors, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3145-3150.
63. Kuhle, B., and Ficner, R. (2014) A monovalent cation acts as structural and catalytic cofactor in translational GTPases, *EMBO J.*, **33**, 2547-2563, doi: 10.15252/embj.201488517.
64. Gao, Y. G., Selmer, M., Dunham, C. M., Weixlbaumer, A., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2009) The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state, *Science*, **326**, 694-699, doi: 10.1126/science.1179709.
65. LaRiviere, F. J., Wolfson, A. D., and Uhlenbeck, O. C. (2001) Uniform binding of aminoacyl-TRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation, *Science*, **294**, 165-168, doi: 10.1126/science.1064242.
66. Mittelstaet, J., Konevega, A. L., and Rodnina, M. V. (2011) Distortion of TRNA upon near-cognate codon recognition on the ribosome, *J. Biol. Chem.*, **286**, 8158-8164, doi: 10.1074/jbc.M110.210021.
67. Valle, M., Sengupta, J., Swami, N. K., Grassucci, R. A., Burkhardt, N., Nierhaus, K. H., Agrawal, R. K., and Frank, J. (2002) Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-TRNA in the accommodation process, *EMBO J.*, **21**, 3557-3567, doi: 10.1093/emboj/cdf326.
68. Schmeing, M. T., Voorhees, R. M., Kelley, A. C., Gao, Y. G., Murphy IV, F. V., Weir, J.R., and Ramakrishnan, V. (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-TRNA, *Science*, **326**, 688-694, doi: 10.1126/science.1179700.
69. Vetter, I. R., and Wittinghofer, A. (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer, *Q. Rev. Biophys.*, **32**, 1-56, doi: 10.1017/S0033583599003480.
70. Kötting, C., Blessenohl, M., Suveyzdis, Y., Goody, R. S., Wittinghofer, A., and Gerwert, K. (2006) A phosphoryl transfer intermediate in the GTPase reaction of Ras in complex with its GTPase-activating protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13911-13916, doi: 10.1073/pnas.0604128103.
71. Pasqualato, S., and Cherfils, J. (2005) Crystallographic evidence for substrate-assisted GTP hydrolysis by a small GTP binding protein, *Structure*, **13**, 533-540, doi: 10.1016/j.str.2005.01.014.
72. Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H. R., and Wittinghofer, A. (1995) Substrate-assisted catalysis as a mechanism for Gtp hydrolysis of P21ras and other GTP-binding proteins, *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 36-44, doi: 10.1038/nsb0195-36.
73. Kothe, U., and Rodnina, M. V. (2006) Delayed release of inorganic phosphate from elongation factor Tu following GTP hydrolysis on the ribosome, *Biochemistry*, **45**, 12767-12774, doi: 10.1021/bi061192z.
74. Savelsbergh, A., Mohr, D., Kothe, U., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. V. (2005) Control of phosphate release from elongation factor G by ribosomal protein L7/12, *EMBO J.*, **24**, 4316-4323, doi: 10.1038/sj.emboj.7600884.
75. Zhou, J., Lancaster, L., Donohue, J. P., and Noller, H. F. (2013) Crystal structures of EF-G – ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation, *Science*, **340**, 1236086, doi: 10.1126/science.1236086.
76. Koch, M., Flür, S., Kreutz, C., Ennifar, E., Micura, R., and Polacek, N. (2015) Role of a ribosomal RNA phosphate oxygen during the EF-G-triggered GTP hydrolysis,

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E2561-E2568, doi: 10.1073/pnas.1505231112.
77. Sondek, J., Lambright, D. G., Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1994) GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin α -GGDP-AIF-4, *Nature*, **372**, 276-279, doi: 10.1038/372276a0.
78. Adamczyk, A. J., and Warshel, A. (2011) Converting structural information into an allosteric-energy-based picture for elongation factor Tu activation by the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9827-9832, doi: 10.1073/pnas.1105714108.
79. Prasad, B. R., Plotnikov, N. V., Lameira, J., and Warshel, A. (2013) Quantitative exploration of the molecular origin of the activation of GTPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20509-20514, doi: 10.1073/pnas.1319854110.
80. Doudna, J. A., and Lorsch, J. R. (2005) Ribozyme catalysis: not different, just worse, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 395-402, doi: 10.1038/nsmb932.

PECULIARITIES IN ACTIVATION OF HYDROLYTIC ACTIVITY OF ELONGATION FACTORS

Review

E. V. Paleskava, M. Y. Kaiumov, S. V. Kirillov, and A. L. Konevega*

*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC "Kurchatov Institute",
188300 Gatchina, Leningrad Region, Russia; E-mail: konevega_al@pnpi.nrcki.ru*

Received July 5, 2020

Revised August 1, 2020

Accepted August 1, 2020

Translational GTPases (trGTPases) belong to the family of G proteins and play key roles at all stages of protein biosynthesis on the ribosome. Unidirectional and cyclic functioning of G proteins is ensured by their ability to switch between the active and inactive states due to GTP hydrolysis accelerated by the auxiliary GTPase-activating proteins. Although trGTPases interact with the ribosomes in different conformational states, they bind to the same conserved region, which, unlike in classical GTPase-activating proteins, is represented by ribosomal RNA. The resulting catalytic sites have almost identical structure in all elongation factors suggesting a common mechanism of GTP hydrolysis. However, fine details of the activated state formation and significantly different rates of GTP hydrolysis indicate the existence of distinctive features upon GTP hydrolysis catalyzed by the different factors. Here, we present a contemporary view on the mechanism of GTPase activation and GTP hydrolysis by the elongation factors EF-Tu, EF-G, and SelB based on the analysis of structural, biochemical, and bioinformatics data.

Keywords: elongation factor, GTP hydrolysis, EF-Tu, EF-G, SelB, translation, ribosome